

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Angelina Panenko

***Escherichia coli* ribosoomi biogeneesis osaleva RNA helikaasi CsdA
substraadispetsiifika analüüs**

Magistritöö

Geenitehnoloogia eriala

30 EAP

Juhendaja *Ph.D* Aivar Liiv

TARTU 2016

INFOLEHT
***Escherichia coli* ribosoomi biogeneesis osaleva RNA helikaasi CsdA**
substraadispetsiifika analüüs

Angelina Panenko

Ribosoom on ribonukleiinhape ja valgu kompleks, mille peamiseks funktsiooniks on valkude biosüntees. *Escherichia coli* ribosoom koosneb suuremast (50S) ja väiksemast alamühikust (30S). Ribosoomi biogeneesis on täpselt koordineeritud kiire protsess, mis hõlmab ribosomaalsete valkude (r-valkude) ja ribosomaalse RNA (rRNA) sünteesi, küpsemist, keemilist modifitseerimist ja funktsionaalseks ribosoomiks assambleerumist. Ribosoomide biogeneesis osalevad ekstraribosomaalsed faktorid, mis aitavad kaasa subühikute assambleerumisele. Antud töös iseloomustatakse CsdA helikaasi roll ribosoomi biogeneesis. CsdA on ATP-sõltuv RNA-helikaas, mis kuulub DEAD-*box* perekonda. See on külmašokivalk, mille geeni kõrvaldamine genoomist põhjustab 50S subühiku eellaspartikli akumulatsioonide madalatel temperatuuridel. Töö eesmärgiks on uurida, millist substraati kasutab CsdA valk ribosoomi assambleerumise käigus. Antud töös hinnatakse erinevate ribosoomipartiklite kui potentsiaalsete substraatide stimuleerivat mõju CsdA ATPaasele aktiivsusele.

Märksõnad: RNA helikaas, CsdA, RNA, ribosoom, biogeneesis, DEAD.

Analysis of the substrate specificity of *Escherichia coli*

RNA helicase CsdA in ribosome biogenesis

Ribosome is a ribonucleoprotein particle responsible for protein biosynthesis. Prokaryotic ribosomes consist of the large (50S) and the small (30S) subunits. Ribosome biogenesis is a highly coordinated and fast process which involves the synthesis, chemical modification and assembly of r-proteins and rRNA into functional ribosomes. During ribosome biogenesis extraribosomal factors help to assemble subunits. One of these factors is CsdA that has been shown to be an ATP-dependent RNA-helicase, and a part of DEAD-*box* proteins. CsdA is a cold-shock protein, whose gene deletion leads to the accumulation of 50S subunit particles at low temperature. In this study, the role of CsdA helicase in ribosome biogenesis is described. The goal is to find out the substrate of CsdA in ribosome assembly. Protein's ATP activity, that describes its ability to work, like helicase, and different substrates' effect on stimulation of protein activity is being studied.

Keywords: RNA-helicase, CsdA, RNA, ribosome, biogenesis, DEAD.

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. Prokariootse ribosoomi struktuur	7
1.1 Ribosoomi 30S subühik	8
1.2 Ribosoomi 50S subühik	10
2. Ribosoomide biogenees	11
2.1 rRNA transkriptsioon ehk süntees	13
2.2 Ribosomaalse RNA küpsemine	14
2.3 Ribosomaalse RNA modifitseerimine	15
2.3.1 Ribosomaalse RNA modifikatsioonide tähtsus	15
2.4 Ribosoomi assambleerumine <i>in vitro</i> ehk rekonstruktsioon	16
2.4.1 Väiksema subühiku rekonstruktsioon	17
2.4.2 Suurema subühiku rekonstruktsioon	17
2.4.3 Subühikute <i>in vivo</i> assambleerumine	18
2.4.4 Ribosoomi assambleerumine <i>in vivo</i> versus rekonstruktsioon <i>in vitro</i>	19
2.5 Teised meetodid ribosomaalse biogeneesi uurimiseks	20
3. Ekstraribosomaalsed faktorid	20
3.1 Ribosoomi-sõltuvad GTPaasid	22
3.2 RNA šaperonid	23
4. RNA helikaasid	25
4.1 DEAD- <i>box</i> RNA helikaaside struktuur	25
4.2 DEAD- <i>box</i> valkude funktsionaalne iseloomustus	27
4.2.1 RNA-sõltuv ATPaasne aktiivsus	27
4.2.2 Lahtiharutamise aktiivsus (<i>unwinding activity</i>)	27
4.3 <i>E. coli</i> DEAD- <i>box</i> RNA helikaasid	27
4.4 CsdA RNA helikaas	29
4.4.1 Vahepartiklite iseloomustamine	29
4.4.2 CsdA helikaasi ensümaatiline aktiivsus	30
4.4.3 Teised CsdA helikaasi funktsioonid	31
EKSPERIMENTAALNE OSA	32
1. Töö eesmärk	32
2. MATERJAL JA METOODIKA	33
2.1 Bakteritüved ja plasmiid	33
2.2 Söötmed	33
2.3 Puhvrid	33
2.4 Ensüümid ja kemikaalid	34

2.5 Aparatuur	34
2.6 <i>E. coli</i> MG Δ<i>rbba</i> Δ<i>csdA</i> tüve konstrueerimine	35
2.6.1 Transformatsioon ja plasmidi eemaldamine.....	35
2.6.2 PCR.....	35
2.6.3 Bakteriofaag P1 viiruslisaadi valmistamine.....	36
2.6.4 Doonortüvede nakatamine bakteriofaagiga P1 ja viiruslisaadi valmistamine.....	36
2.6.5 Bakteriofaag P1 eraldamine kloroform meetodiga	36
2.6.6 Transduktsioon	36
2.7 Rakulisaadi valmistamine ja ribosoomide fraktsioneerimine.....	37
2.8 Ribosoomide soolaga „pesemine“	38
2.9 CsdA valgu ATPaasse aktiivsuse test	38
3. TULEMUSED JA ARUTELU	40
3.1 Eksperimentaalne strateegia	40
3.2 CsdA ATPaasse aktiivsuse analüüs	42
3.3 <i>Escherichia coli</i> tüve MG1655 (<i>Arbba</i> Δ <i>csdA::Km</i>) konstrueerimine.....	45
3.3.1 <i>E. coli</i> tüvede iseloomustamine	46
3.3.2 <i>E. coli</i> MG Δ <i>rbba</i> Δ <i>csdA</i> ja MG Δ <i>rbba</i> tüve rRNA sisalduse analüüs.....	49
4. <i>E. coli</i> tüvede ribosoomi partiklite võime hüdrolüüsida ATP-d	50
5. Ribosoomi partiklite stimuleeriv toime CsdA valgu ATPaasse aktiivsusele.....	52
5.1 <i>E. coli</i> MG Δ <i>rbba</i> Δ <i>csdA</i> tüve ribosoomide stimuleeritav toime	55
KOKKUVÕTE	57
SUMMARY	58
TÄNUSÕNAD	59
KASUTATUD KIRJANDUS	60
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	70
Lihtlitsents.....	71

KASUTATUD LÜHENDID

Å – angström

Ala –alaniin

Amp –ampitsilliin

Asp - aspartaat

ATP - adenosiin-5'-trifosfaat

CP – tsentraalne kühm (ingl k *central protuberance*)

dpm – lagunemine minutis (*decay per minute*)

DTT – ditiotreitol

Gln – glutamiin

GTP – guanosiin-5'-trifosfaat

HPLC – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (ingl k *high-pressure liquid chromatography*)

K – „kooritud“

kbp – kilo-aluspaar (*kilo base pairs*)

kDa – kilodalton

Km – kanamütsiin

LB – Luria-Bertani agarsööde

L-valgud – suure subühiku valgud (*large*)

MDa – megadalton

nt - nukleotiid

OV puhver – *overlay* puhver

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

PTC – peptidüültransferaasne tsenter (*peptidyl transfer center*)

RI – vaheühend (*reconstitution intermediate*)

RNA – ribonukleiinhape

rrn – ribosomaalse RNA operon

r-valgud – ribosomaalsed valgud

S – Svedbergi ühik, sedimentatsioonikoefitsient

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

SF – superperekond (*superfamily*)

SRL – sartsiin-ritsiinling (*sarcin-ricin loop*)

S-valgud – väikse subühiku valgud (*small*)

TBE – TrisHCl-boorhape-EDTA

SISSEJUHATUS

Ribosoom on ribonukleiinhape ja valgu kompleks, mille peamiseks funktsiooniks on valkude biosüntees. *Escherichia coli* ribosoom koosneb suuremast (50S) ja väiksemast alamühikust (30S). Suurema subühiku moodustavad kaks rRNA molekuli: 23S rRNA ja 5S rRNA ning 33 ribosomaalset valku. Väiksema subühiku koostises on 16S rRNA molekul ja 21 ribosomaalset valku.

Ribosoomi biogenees on väga koordineeritud protsess, mille käigus sünteesitud ribosomaalne RNA ja valgud pannakse kokku funktsionaalseks ribosoomiks. Prokarüootses rakus on ribosoomi assambleerumisse kaasatud ekstraribosomaalsed faktorid, mis osalevad RNA voltumises. Ühe grupi nendest faktoritest moodustuvad DEAD-box RNA helikaasid, mille hulka kuulub CsdA valk, ribosoomi assambleerumises osalev külmašokivalk. CsdA valku on uuritud mitmete aastate jooksul, kuid selle valgu funktsionaalne iseloomustus on veel puudulik (Turner *et. al.*, 2007).

Käesoleva töö kirjanduse ülevaade koosneb viiest peatükist. Kahes esimeses antakse ülevaade ribosoomi struktuurist ja selle biogeneesist *Escherichia coli* näitel. Kolmandas ja neljandas peatükides käsitletakse ekstraribosomaalsete valkude rolli ribosoomide biogeneesis. Viimases osas, neljandas iseloomustatakse lähemalt CsdA helikaasi ja selle funktsioone.

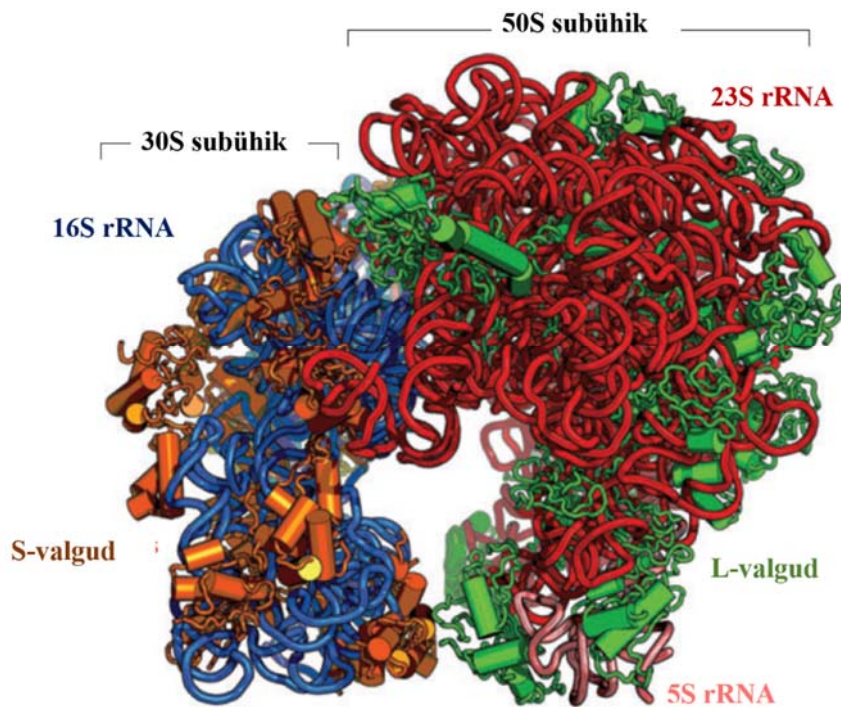
Magistritöö eesmärgiks on iseloomustada CsdA helikaasi rolli ribosoomide assambleerumises ja välja selgitada, millist substraati kasutab CsdA valk ribosoomi biogeneesil *in vivo*. Püstitatud eesmärgi saavutamiseks analüüsitakse uuritava valgu ATPaasset aktiivsust, mis iseloomustab CsdA valgu võimet töötada helikaasina.

1. Prokariootse ribosoomi struktuur

Ribosoom on ribonukleiinhappe-valgu kompleks, mis teostab valkude biosünteesi ehk translatsiooni. Prokariootse ribosoomi läbimõõt on 210 Å ning molekulmass on ligikaudu 2,4 MDa. *E. coli* ribosoom koosneb kahest subühikust: 50S ja 30S, mis valgu sünteesi käigus assotsieeruvad ja moodustavad ribosoomi (joonis 1), mille sedimentatsioonikoefitsient on 70S (Svedbergi ühikuid; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Ramakrishnan ja Moore, 2001; Shajani *et al.*, 2011). Alamühikud koosnevad $\frac{2}{3}$ ribosomaalsest RNA-st (rRNA) ja $\frac{1}{3}$ valkudest (r-valgud), mille pikkus tavaliselt varieerub 25 – 300 aminohappe vahel (Ramakrishnan ja Moore, 2001; Wilson *et al.*, 2009). 70S ribosoom sisaldab kolme tRNA seondumispiirkonda. Nendeks on aminoatsüül-tRNA piirkond (A-site), peptidüül-tRNA piirkond (P-site) ja väljumis-tRNA piirkond (E-site; Melnikov *et al.*, 2012).

Subühikute assotsieerumisel mängivad olulist rolli 12 subühikute vahelist silda, mis moodustuvad ~30 erinevat interaktsiooni: RNA-RNA, RNA-valk või valk-valk (Liu ja Fredrick, 2016). Valk-valk ja valk-RNA interaktsioone (B1a, B4, B5, B6, B7b ja B8 sillad) moodustavad S13, S19, L2, L5 ja L14 r-valgud. RNA – RNA vahelised sillad on B2a-c, B3, B5 ja B7a (Gao *et al.*, 2003). Valdav osa *E. coli* ribosoomi sildadest moodustuvad 30S subühiku tsentraalse domeeni (heeliksid 23, 24) ja 3' minoorse domeeni (heeliks 44) ning 50S subühiku IV domeeni (heeliksid 64, 67-71) vahel (Gao *et al.*, 2003). Sillad hoiavad ribosoomi subühikud koos ning aitavad kaasa ribosoomi tervikliku struktuuri säilitamisele (Gabashvili *et al.*, 2000). Subühikute vahelised sillad on olulised dekodeerimise ja translokatsiooni reaktsioonides. Nimelt need on kaasatud tRNA liikumisse läbi ribosoomi ja dekodeeriva tsentri vahelisel signaaliülekanal (Yusupov *et al.*, 2001).

Valk-valk ja valk-RNA subühikute vahelised interaktsioonid võivad osaleda translatsiooni dünaamilistes muutustes (*ratchet-like* liikumine; Gao *et al.*, 2003). See tähendab, et subühikute vaheliste struktuuride ümber paigutamisel tekib ribosoomi kompaktest struktuurist vabama struktuuriga kompleks. See viib paljude r-valkude konformatsiooni muutustele (Gao *et al.*, 2003; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007) (Frank ja Agrawal, 2000).

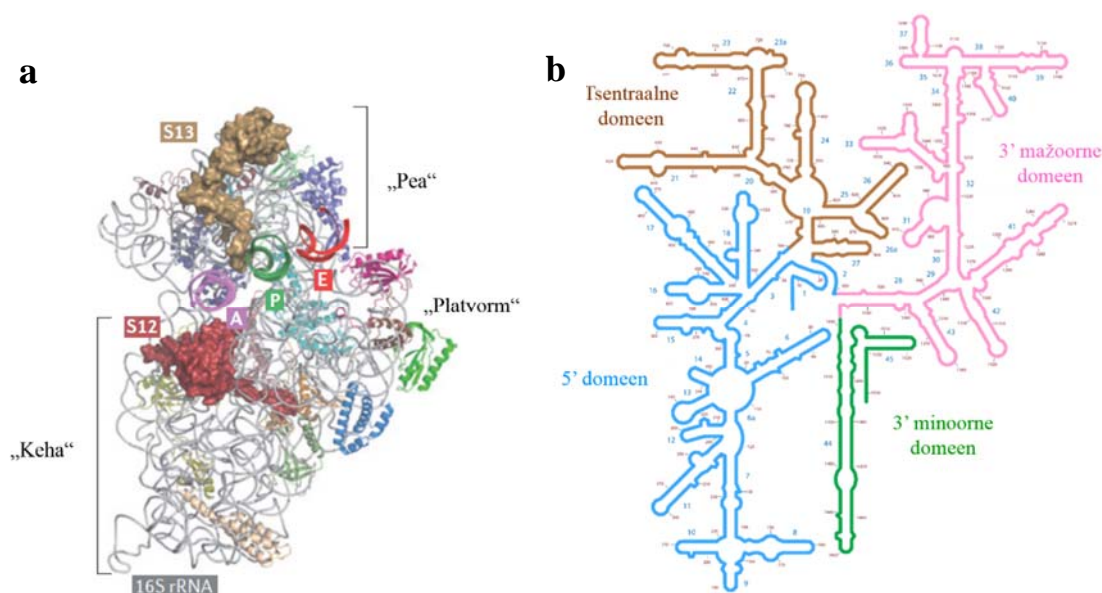


Joonis 1. *E. coli* ribosoomi struktuur. Väike subühik (30S) on ribosoomi vasakul poolel ja 50S on paremal poolel. 16S rRNA ja 23S rRNA on illustreeritud vastavalt sinisega ja punasega. S-valgud (S ehk *small*) on 30S ribosomaalsed valgud (oranž) ja L-valgud (L ehk *large*) on pärit 50S subühikust, mille koosseisus on veel 5S rRNA (roosa). Joonis on kohandatud artiklist Shajani *et al.*, (2011).

1.1 Ribosoomi 30S subühik

Ribosoomi väike subühik (30S) koosneb 21-st r-valgust (S1 – S21) ja 16S rRNA-st, mis on 1542 nukleotiidi pikk (Shajani *et al.*, 2011). 16S rRNA on jaotatud neljaks domeeniks, mis koos r-alkudega moodustavad struktuurse 30S subühiku (joonis 2b). 16S rRNA 5' domeen ja r-valgud (S4, S5, S12, S16, S17, S20) koos 3' minoorse domeeniga formeervad väiksema subühiku „keha“ (joonis 2a). Interakteerudes S1, S6, S8, S11, S15, S18 r-alkudega, kujundab tsentraalne domeen 30S subühiku „platvormi“. Valgurikka „pea“ piirkonna moodustab 3' mažoorne domeen koos S2, S3, S7, S9, S10, S13, S14, S19 r-alkudega (Wilson *et al.*, 2009; Wimberly *et al.*, 2000). 30S subühiku 16S rRNA 3'otsas, „pea“ ja „keha“ morfoloogiliste struktuuride vahel paikneb anti-Shine-Dalgarno järjestus, mille abil seondub mRNA ribosoomile (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Wilson *et al.*, 2009). 16S rRNA heeliks 44

ja r-valgud moodustavad dekodeeriva tsentri, kus toimub mRNA ja tRNA koodon-antikoodon paardumine (Wilson 2009).



Joonis 2. 30S subühiku struktuur. **(a)** 30S tertsiaarne struktuur suurema subühiku poolt vaadatuna. 16S rRNA on näidatud hallina ja r-valgud on värvilistena. Lisaks struktuursetele elementidele on näidatud tRNA A-, P- ja E- seondumissaidid. Joonis on kohandatud artiklist Yamamoto *et al.*, (2014). **(b)** 16S rRNA sekundaarne struktuur. 16S rRNA jaotakse tsentraalseks domeeniks (pruun), 5' domeeniks (sinine), 3' minoorseks domeeniks (roheline) ja 3' mažoorseks domeeniks (roosa). Joonis on kohandatud veebilehelt <http://apollo.chemistry.gatech.edu/>.

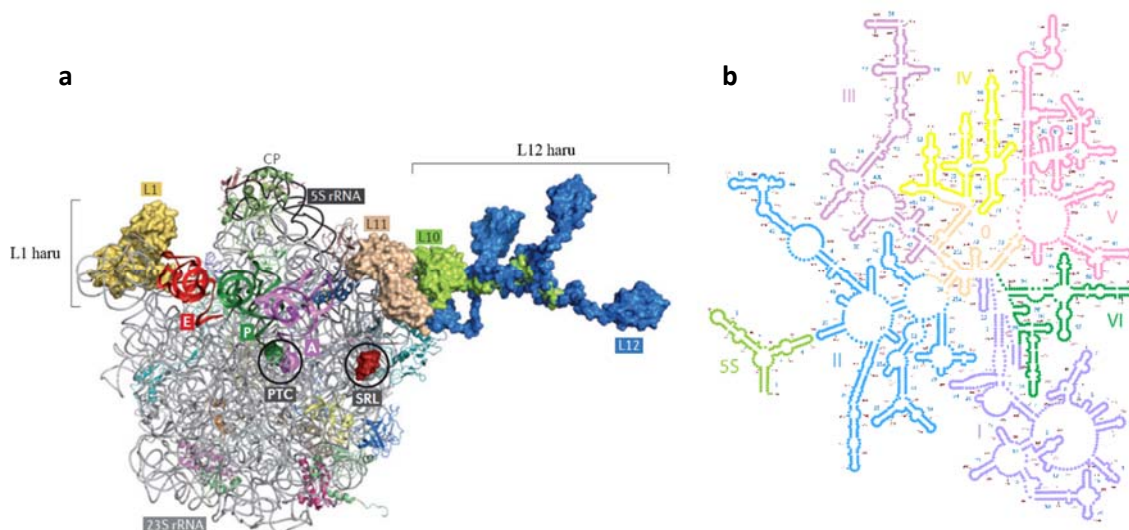
Valkude biosünteesil on 30S subühikul kaks peamist funktsiooni. Esiteks osaleb 30S subühik mRNA esmases mobilisatsioonis ja translatsiooni initsiatsioonikompleksi moodustumises (Wimberly *et al.*, 2000; Yusupov *et al.*, 2001). Teiseks vahendab ribosoomi väike subühik translatsiooni kvaliteedikontrolli, kus tagab mRNA koodoni interakteerumise talle vastava tRNA antikoodoniga (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Lisaks kahele peamisele funktsioonile osaleb 30S subühik translokatsioonil, juhtides mRNA ja tRNA ühe tripleti haaval läbi ribosoomi (Ramakrishnan, 2002).

1.2 Ribosoomi 50S subühik

Ribosoomi suures subühikus (50S) on 33 r-valku (L1 – L36) ning kaks ribonukleiinhapet: 23S rRNA (2904 nt) ja 5S rRNA (120 nt). 23S rRNA sekundaarstruktuur on jagatud seitsmeks domeeniks, mille hulgas 5S rRNA käsitletakse seitsmenda domeenina (joonis 3b). Omavahel kontakteerudes moodustavad rRNA ja r-valgud kompaktse poolkerakujulise struktuuri, millel eristuvad kolm väljaulatuvat jätket: L1-haru, L12-haru ja tsentraalne kühm (CP, ingl k *central protuberance*; joonis 3a; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). L1 haru koosneb L1 r-valgust ning 23S rRNA heeliksitest 76, 77 ja 78. L1 haru interakteerub E-saidis paikneva tRNA õlaga ja väikese alamühiku S7 valguga võimaldades dünaamilist aktiivsust, mille tulemusel saab ribosoomist vabastada E-saidi tRNA (Nikulin *et al.*, 2003).

L12 haru koosneb L10, L11 valkude ja 23S rRNA heeliksist 42 ja 44 interaktsioonist ning tetrameerist L7/L12, mis interakteerub otseselt L10 ribosomaalse valguga. Selle haru abil vahendab 50S subühik GTP-d siduvate regulaatorvalkude (EF-Tu, EF-G) seondumist, mis osalevad translatsiooni etappides: initsiatsioonis, elongatsioonis ja terminatsioonis (Ban *et al.*, 2000; Diaconu *et al.*, 2005). L12-haru läheduses asuv sartsiin-ritsiinling (SRL): kujutab endast 23S rRNA heeliksi 44 linki, mis interakteerub elongatsioonifaktorite G-domeeniga moodustades seondumissaiti (Yamamoto *et al.*, 2014; Yusupov *et al.*, 2001).

50S alamühiku keskel asub peptidüültransferaasne tsenter (PTC, ingl k *peptidyl transfer center*), kus toimub polüpeptiidsideme süntees. Ribosoomi poolt moodustunud polüpeptiidid väljuvad ribosoomist PTC alt algava tunneli kaudu (Liu ja Fredrick 2016; Melnikov *et al.*, 2012). 70S ribosoomis on kolm tRNA seondumissaiti, mis on selgesti eristatavad 30S ja 50S alamühikutel (joonis 2a ja 3a): aminoatsüül-(A)-sait, peptidüül-(P)-sait ja väljumis-(E)-sait (Liu ja Fredrick 2016; Melnikov *et al.*, 2012).



Joonis 3. 50S subühiku struktuur. **(a)** 50S tertsiaarne struktuur väiksema subühiku poolt vaadatuna. 50S koosneb 23S rRNA-st (hall), 5S rRNA-st (tumehall) ja r-valkudest (illustreeritud värvilisena). On näidatud peptidüül-transferaasne tsenter (PTC), sartsiiin-riitsiinling (SRL) ning tRNA A-, P- ja E- seondumissaidid. Joonis on kohandatud artiklist Yamamoto *et al.*, (2014). **(b)** 50S subühiku sekundaarne struktuur. Joonisel on toodud välja kuus domeeni ja 5S rRNA kui VII domeen. Joonis on kohandatud veebilehelt <http://apollo.chemistry.gatech.edu/>.

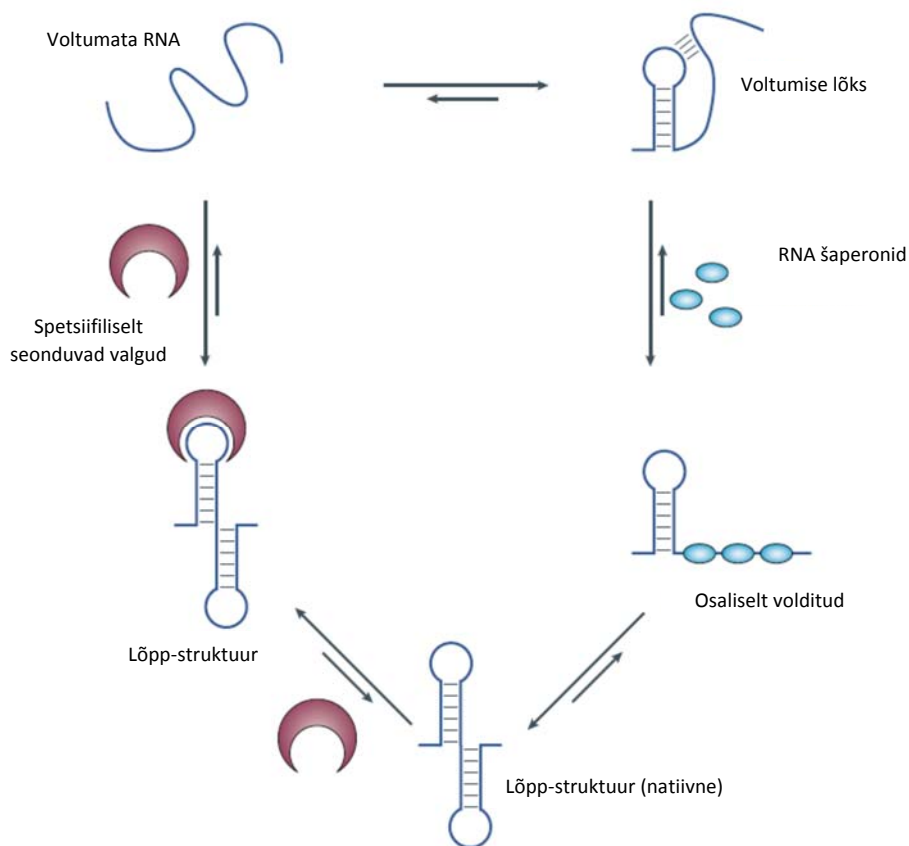
Translatsiooni protsessis osaleb suur subühik translatsioonifaktorite seondumises ribosoomile ning see katalüüsib peptiidsideme sünteesi, mis leiab aset 50S subühiku peptidüültransferaases tsentris (PTC). Lisaks osaleb 50S subühik translokatsiooniprotsessis, kus translatsioonifaktorite seondumist vahendavad r-valgud (L7/L12)₄ suure subühiku L12-harul (Ban *et al.*, 2000; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Ramakrishnan, 2002).

2. Ribosoomide biogenees

Ribosoomide biogenees on protsess, mille käigus sünteesitakse ribosomaalne RNA (rRNA) ja r-valgud ning toimub nende assambleerumine funktsionaalseteks alamühikuteks (50S ja 30S). Ribosoomi assambleerumises ehk kokkupakkimise protsessis toimub rRNA transkripti küpsemine, modifitseerimine ja voltumine. Selle käigus transleeritakse, modifitseeritakse r-valke ning toimub nende voltumine. Ribosoomide biogenees on kotranskriptsiooniline protsess, mis tähendab seda, et RNA voltumine ja r-valkude seondumine rRNA-le algab juba RNA sünteesi käigus (Shajani *et al.*, 2011; Wilson ja Nierhaus, 2007).

Biogeneesi keskne sündmus on rRNA korrektne voltumine (*RNA folding*). Ribosomaalne RNA on paindlik molekul, mis võib võtta erinevaid struktuure: üks ja sama RNA võib olla rohkem või vähem stabiilne sõltuvalt oma sekundaarstruktuuri elementidest. Ribosomaalses biogeneesis peab olema tagatud, et tekiks õige RNA struktuur (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Shajani *et al.*, 2011; Williamson, 2008).

Stabiilse struktuuri saavutamisel voltumata RNA molekulist võib otseselt moodustuda õigesti volditud RNA struktuur. Teine võimalus on see, et RNA voltumine võib toimuda läbi mitmete vaheetappide, kus RNA molekul on energaetiliselt stabiilses vaheolekus, mis ei ole RNA lõpp-struktuur. RNA võib omada palju erinevaid vaheolekuid, kuid lõpuks peab jõudma stabiilsemasse konformatsiooni. RNA voltumist reguleerivad ribosoomi biogeneesis osalevad valgud. Esiteks, spetsiifiliselt seonduvad valgud interakteeruvad RNA molekuliga stabiliseerides RNA struktuuri. Juhul, kui tekib RNA voltumise lõks (*folding trap*), RNA helikaasid, mis käituvad nagu šaperonid, seonduvad voltumata RNA molekulidele, vahendades õiget RNA struktuuri moodustamist (joonis 4; Schroeder *et al.*, 2004). Joonisel on skemaatiliselt illustreeritud helikaaside nagu šaperonide ja spetsiifiliste valkude roll rRNA voltumisel.



Joonis 4. RNA voltumine valkude vahendusel. Spetsiifiliselt seonduvad valgud (punased) ja RNA helikaasid (sinised) seonduvad RNA voltumata struktuurile (vasakul pool üleval) vahendades õiget RNA konformatsiooni lõpp-struktuuris (all). Spetsiifiliselt seonduvad valgud stabiliseerivad õige struktuuriga RNA-d. RNA helikaasid aitavad kaasa õige RNA struktuuri moodustamist voltumise lõksu tekkimisel (üleval paremal pool). Protsessid on pöörduvad ja kulgevad vaheetappidega. Joonis on kohandatud artiklist Schroeder *et al.*, (2004).

2.1 rRNA transkriptsioon ehk süntees

E. coli genoom sisaldab seitse transkriptsioonilist ühikut ehk operoni: *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG*, *rrnH*. Kõikidel *rrn* operonidel on üldjoontes sarnane ehitus (joonis 5) ning see on kõrgelt konserveerunud universaalne esmase rRNA transkripti ülesehituse muster kõikides elusorganismides (Asai *et al.*, 1999; Condon *et al.*, 1995). Operoni alguses on kaks promootorit (*P1* ja *P2*), mille vahel on 120 aluspaare. *P1* promootor tagab võimeka *rrn* operonide transkriptsiooni eksponentsiaalses faasis ning *P2* promootor vastutab rRNA sünteesi eest statsionaarses faasis. 16S ja 23S geenide vahel on üks või kaks tRNA järjestust sõltuvalt operonist ning *rrnC*, *rrnD* ja *rrnH* operonide distaaltsetes otstes 5S rRNA kõrval on tRNA järjestused (Maeda *et al.*, 2015; Srivastava ja Schlessinger, 1990).



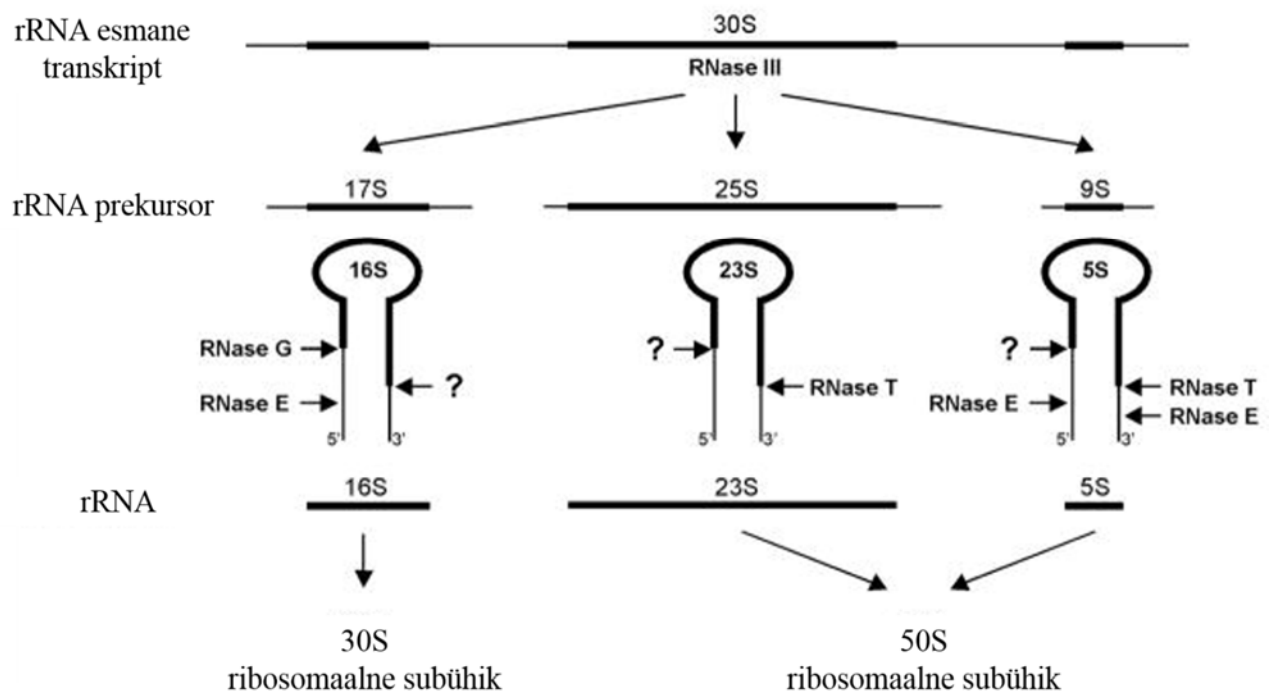
Joonis 5. *E. coli* rRNA operonide üldine struktuur. Operoni alguses on kaks promootorit (*P1* ja *P2*) ja lõpus terminaator (*T*). Hallide ristkülikutena on näidatud 16S rRNA, 23S rRNA, 5S rRNA ja tRNA geenid. Joonis kohandatud artiklist Jin *et al.*, 2012.

RNA operonid on vajalikud rakkude kiireks kohanemiseks uute keskkonnatingimustega. Aastal 1995 Condon kolleegidega viisid läbi uuringu, kus MG1655 tüve *E. coli* bakterirakkudes inaktiveeriti üks kuni neli operoni. Inaktiveeritud operonidega rakud kasvatati logaritmilise kasvufaasini. Tulemused näitasid, et mida rohkem *rrn* operone oli inaktiveeritud, seda rohkem aega kulus rakkudel logaritmilise faasi saavutamiseks (Condon *et al.*, 1995). Sarnase tulemuse said teadlased Jaapani ülikoolis, kus näitasid, et operoni puudumisel aeglustub rakukasvu kiirus ning see korreleerub puuduvate operoni arvuga. Samas on teada, et ribosomaalne biogenees kulgeb edukalt ka ühe operoniga (Wada, 1998).

2.2 Ribosomaalse RNA küpsemine

Ribosomaalse RNA operon transkribeeritakse esmase transkriptina (30S RNA), mis lõigatakse ribonukleaaside poolt 5S, 16S ja 23S molekulideks (joonis 6; Srivastava ja Schlessinger, 1990). Ribosomaalse RNA küpsemine (*processing*) on mitmeetapiline protsess. Esiteks, ribonukleoproteaas RNase III tunneb ära mittespetsiifilise järjestuse rRNA esmases transkriptis ja lõhub fosfodietersidemeid tekitades 17S, 25S ja 9S rRNA vaheproduktid, millest moodustuvad küpsed 16S, 23S ja 5S rRNA vastavalt (joonis 6; Davies *et al.*, 2011; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). 16S rRNA vaheprodukti (17S) 5' ja 3' otses on 115 ja 33 lisanukleotiidi vastavalt. 23S rRNA eellane (25S) sisaldab kolm või seitse lisanukleotiidi 5' otsas ja seitse kuni üheksa nukleotiidi 3' otsas. 5S rRNA vaheprodukti (9S) rRNA koostises võib olla üks või kaks tRNA järjestust (sõltuvalt *rrn* operonist) ning 5' otsas 84 lisanukleotiidi ja 3' otsas 42 (Shajani *et al.*, 2011; Srivastava ja Schlessinger, 1990).

Valmimise etapis moodustavad vaheproduktidest küpsete otstega rRNA molekulid. Ribonukleaas RNase T viib läbi 23S ja 5S rRNA 3' otste küpsemise. RNase E ja RNase G nukleasid toimel toimub 16S rRNA 5' otsa küpsemine. RNase E, PNPase, RNase II, PH, D või BN nukleasid vahendavad 5S rRNA küpsemise 9S RNA vaheproduktist (joonis 6; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Li ja Deutscher, 1995; Srivastava ja Schlessinger, 1990).



Joonis 6. Ribosomaalse RNA küpsemise etapid. rRNA esmasest transkriptist (30S RNA) RNase III toimel tekib kolm prekursorit: 17S, 25S ja 9S, millest moodustuvad küpsed 16S,

23S ja 5S rRNA molekulid. Küpsemise etappides osalevad nukelaasid: RNase G, RNase E, RNase T ja RNase III. Küsimärgiga tähistatakse identifitseerimata ferment. Kohandatud artiklist Davies *et al.*, 2011.

2.3 Ribosomaalse RNA modifitseerimine

Ribosoomi biogeneesil toimub rRNA modifitseerimine posttranskriptsiooniliselt, mis tähendab, et modifitseeritakse valmis sünteesitud rRNA-d või juba valmispakitud ribosoomid (Jiang *et al.*, 2016). 16S rRNA sisaldab kümme metülatsiooni ja ühe pseudouridiini (5- β -ribofuranosüüluratsil). 23S rRNA-s on 13 metülatsiooni, üheksa pseudouridiini, üks metüleeritud pseudouridiin, üks dihüdrouридиin ja üks 5-hüdrosütsüstidiin (Havelund *et al.*, 2011; Ofengand ja Del Campo, 2004; Sivaraman *et al.*, 2004). Suurem osa modifikatsioonidest on koondunud dekodeerimistsentrisse 16S rRNAs ja peptidüültransferaasse tsentrisse 23S rRNAs (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Wilson ja Nierhaus, 2007).

Väikses ja suures subühiku rRNA modifitseerimine toimub erinevates biogeneesi etappides. 30S subühiku puhul enamik modifikatsioone teostatakse assambleerumise hilises etapis või pärast subühiku kokkupakkimist. 50S subühiku RNA modifikatsioonid sünteesitakse assambleerumise varastes etappides, kus ribosoom pole veel lõplikult kokkupakitud (Weitzmann *et al.*, 1993). Selle põhjuseks võib olla see, et 30S subühik on väiksem, kui 50S ning selle pärast modifitseeritavate ensüümide ligipääs 16S rRNA-le on keerulisem kui 23S rRNA juurde (Siibak ja Remme, 2010).

2.3.1 Ribosomaalse RNA modifikatsioonide tähtsus

Ribosomaalse RNA modifikatsiooni spetsiifilisus sõltub r-valkudest ja RNA voltumise protsessist. Assambleerumise protsessis toimuvad RNA modifitseerimine ja voltumine paralleelselt. RNA voltumine on vaheetappidega protsess, kus tekivad energeetilised stabiilsed struktuurid (voltumise lõksud). Need samad struktuurid tuntakse modifitseeritavate ensüümide poolt (Holmes ja Culver, 2004; Ofengand ja Del Campo, 2004; Siibak ja Remme, 2010). Ribosomaalsed valgud reguleerivad rRNA voltumist, mis võib hõlbustada äratundmissaiti moodustamist rRNA modifitseeritavate ensüümide jaoks. Samuti võivad inhibeerida rRNA modifitseerimist seondudes rRNA struktuurile ja „varjates“ seondumiskoha (Siibak ja Remme, 2010; Weitzmann *et al.*, 1993).

Mõned rRNA modifitseeritavad ensüümid omavad olulist rolli ribosoomi biogeneesis. Üksikute ensüümide või assambleerumiskomplektide geeni puudumine võib põhjustada 50S eellaspartiklite akumulereerumist, mis sedimenteervad 40S või 45S juures. Näiteks, aastal 2015 Arai *et al.*, katseliselt näitasid, et RlmE metüültransferaasi puudumine põhjustab aeglase rakukasvu ja 45S vahepartiklite akumulereerumist (Arai *et al.*, 2015). RlmE teostab 2'-O-metüüluridiini modifikatsiooni positsioonis 2552 (Um2552) 23S rRNA heeliksis 92 (Caldas *et al.*, 2000). See on kõrgelt konserveerunud ensüüm kõikides elusorganismides, mis võib tähendada, et RlmE on äärmiselt oluline ribosoomi assambleerumise protsessis. 2'-O-metüülrühma puudumine Um2552 positsioonis mõjutab lugemisraami nihe kiirust *E. coli* bakterirakus, kus puudub *rlmE* geen (Caldas *et al.*, 2000). See tähendab, et RlmE metüültransferaas vahendab translatsiooniprotsessi. *RlmE* geeni deletsioon põhjustab 45S vahepartiklite akumulereerumist madalatel temperatuuridel. Kvantitatiivse analüüsi abil kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC, *high-pressure liquid chromatography*) meetodiga Arai *et al.* (2015) illustreerisid, et Um2552 modifikatsioon leiab aset hilises 50S assambleerumise etapis, mis viib sellele, et akumulereervad 45S on 50S eellaspartiklid.

2.4 Ribosoomi assambleerumine *in vitro* ehk rekonstruktsioon

Ribosomaalse biogeneesi uurimine aitab mõista translatsiooniprotsessi tervikuna ning võimaldab laiemalt aru saada interaktsioone, mis toimuvad RNA-valk kompleksi moodustumisel. *In vitro* rekonstruktsioon on põhiline ribosoomi assambleerumise uurimise meetod, millega on võimalik saada funktsionaalseid ribosoome, kasutades selleks puhastatud ribosoomi komponente. *In vitro* rekonstruktsioon on sõltumatu protsess ehk kogu vajalik informatsioon assambleerumiseks peidub r-valkudes ja rRNAs. Energiabarjääre *in vitro* aitavad ületada kõrge temperatuur ja soolakontsentratsioon. *In vitro* 30S ja 50S subühikute assambleerumine toimub mitmeetapiliselt (joonis 7; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Shajani *et al.*, 2011).

Ribosoomide *in vitro* assambleerumise valkude seondumine on termodünaamiliselt omavahelises sõltuvuses. Ribosomaalseid valke saab jagada RNA-ga seondumise järjekorra alusel: primaarseteks, sekundaarseteks ja tertsiaarseteks r-valkudeks (Held *et al.*, 1974; Shajani *et al.*, 2011; Sykes ja Williamson, 2009). Primaarsed seondumisvalgud otseselt seonduvad rRNA-ga, kindla ribosoomi osaga. Sekundaarsete r-valkude seondumine sõltub primaarsest seondumisest ning tertsiaarsed ribosomaalsete valkude liitumine toimub peale sekundaarsete r-valkude seondumist. Osa r-valke omavad ribosoomi biogeneesis ainult

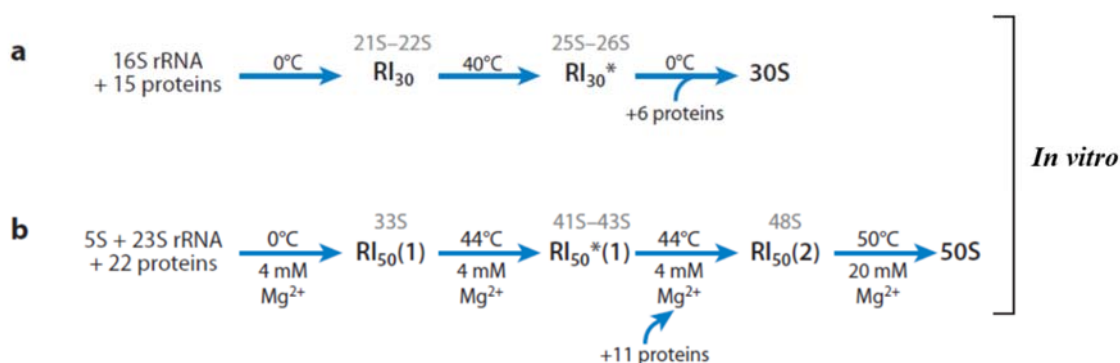
struktuurset funktsiooni, näiteks S16 ja S18 r-valgud. (Shajani *et al.*, 2011; Sykes ja Williamson, 2009).

2.4.1 Väiksema subühiku rekonstruktsioon

30S subühiku rekonstruktsioon koosneb kolmest staadiumist. Esimene rekonstrueerimise vahepartikkel tekib 16S rRNA-st ja varase assambleerumise 15 r-alkudest. Valminud vaheühend RI (ingl k *reconstitution intermediate*) sedimenteerub 21S - 22S juures. Järgmises 30S assambleerumise etapis *in vitro* toimuvad ümberkorraldused 40°C juures ning selle tulemusel tekib 25S - 26S vahepartiklid. Kuue hilise assambleerumise r-valgu lisamisel valmib funktsionaalne 30S subühik (joonis 7a; Held *et al.*, 1974; Shajani *et al.*, 2011). Väiksema subühiku konstrueerimiseks võib kasutada sünteetiliselt valmistatud RNA, mis on aktiivne ja korralikult pakitakse 30S subühikuks. Suurema subühiku puhul sünteetiline RNA ei ole funktsionaalne (Liiv ja Remme, 2004).

2.4.2 Suurema subühiku rekonstruktsioon

50S subühiku *in vitro* rekonstrueerimise mehhanismi töötasid välja aastal 1974 Nierhaus ja Dohme (Nierhaus ja Dohme, 1974). See on kolmeetapiline protsess ja toimub kõrgema temperatuuri juures (joonis 7b). Esimene vahepartikkel sedimenteeritakse 33S juures ning koosneb 5S rRNA-st, 23S rRNA-st ja 22 valkudest. 44°C temperatuuri töötlemise järel tekib 41S – 43S vahepartikkel. Sellel etapil L4, L13, L20, L22 ja L24 valgud muudavad vahepartiklite konformatsiooni. Moodustunud 41S – 43S partiklile lisatakse üksteist r-valku, mille tagajärjel moodustub 48S sedimentatsioonimääruga vahepartikkel. Tekkinud vahepartikkel kuumutatakse ja tõstetakse magneesiumioonide kontsentratsiooni (20 mM), mille tulemusena tekib aktiivne 50S subühik (Spillmann *et al.*, 1977).



Joonis 7. Ribosoomi subühikute *in vitro* rekonstruktsioon. (a) 30S subühiku *in vitro* rekonstruktsiooni mehhanism; (b) 50S subühiku *in vitro* rekonstruktsioon; RI – vaheühend

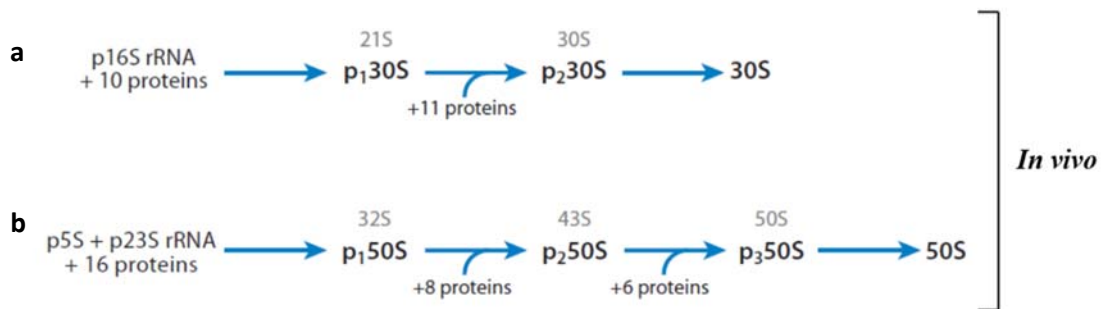
(ingl k *reconstitution intermediate*), RI* erineb eelnevast vaheühendist konformatsiooni poolest. Joonis on kohandatud artiklist Shajani *et al.*, 2011.

2.4.3 Subühikute *in vivo* assambleerumine

Väiksema ja suurema subühikute *in vivo* biogeneesil võivad tekkida vahepartiklid, mida saab identifitseerida juhul, kui nad on piisavalt stabiilsed (joonis 8). Sellepärast ei saa välistada, et *in vivo* biogeneesil võib esineda rohkem, kui seni iseloomustatud vaheolekuid (Shajani *et al.*, 2011).

30S subühiku *in vivo* assambleerumisel teoreetiliselt võib esineda kaks stabiilset vaheetappi: p₁30S ja p₂30S (joonis 8a; Lindahl, 1975). p₁30S partiklites on rRNA-le seondunud ligikaudu pooled S-valkudest ning antud vahepartikli sedimentatsioonikoefitsient on 21S. Funktsionaalselt inaktiivne p₂30S sisaldab kogu S-valkude komplekti, kuid selle 16S rRNA on lõplikult protsessimata (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007).

50S subühiku assambleerumine *in vivo* võib läbida kolme stabiilset vaheolekut: p₁50S, p₂50S ja p₃50S, mis sedimenteervad vastavalt 32S, 43S ja 50S juures (joonis 8b). p₃50S partikkel sisaldab kõiki L-valke ja metüleeritavates tingimustes sellest moodustub aktiivne 50S subühik (Lindahl, 1975).



Joonis 8. Ribosoomi subühikute *in vivo* assambleerumine. **(a)** 30S subühiku *in vivo* assambleerumisel võib eksisteerida kaks vaheolekut: p₁30S ja p₂30S sedimentatsiooni määruga 21S ja 30S vastavalt; **(b)** 50S subühiku *in vivo* assambleerumine tekib läbi kolme vaheetapi: p₁50S (32S), p₂50S (43S) ja p₃50S (50S). Joonis on kohandatud artiklist Shajani *et al.*, 2011.

2.4.4 Ribosoomi assambleerumine *in vivo* versus rekonstruktsioon *in vitro*

Vaatamata ribosoomi *in vitro* ja *in vivo* assambleerumise suurele sarnasusele erinevad nad mitmeti. *In vivo* assambleerumine toimub paralleelselt translatsiooniga (de Narvaez ja Schaup 1979). *In vitro* ribosoomi rekonstruktsioon on aeganõudvam protsess, mis kestab kuni poolteist tundi ja vajab kõrgemat temperatuuri kui 37°C. Kuid *in vivo* biogeneesi käigus ribosoomi subühikute assambleerumiseks 37°C juures kulub vaid mõned minutid (Nierhaus, 1991).

In vivo biogenees on palju võimekam, kui *in vitro* rekonstruktsioon. Selle põhjuseks on see, et *in vitro* assambleerumises ei toimu transkriptsiooni, mis tähendab, et kogu RNA on suunatud sellele, et initsieerida assambleerumist (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Williamson, 2003). Lisaks paljud ribosoomi biogeneesi protsessid (transkriptsioon, RNA modifitseerimine, voltumine) toimuvad paralleelselt. See tagab õigeaegselt funktsionaalse ribosoomi moodustamise (Shajani *et al.*, 2011; Williamson, 2003).

In vitro assambleerumiseks kasutatakse ainult puhastatud ribosoomide komponente, kuid *in vivo* biogeneesil kaasatakse mitteribosomaalsed faktorid, mis aitavad kaasa ribosoomide kokkupakkimisele. RNA šaperonid ja RNA helikaasid hõlbustavad ribosoomi assambleerumist, kuid kogu ribosoomi assambleerumiseks vajalik informatsioon on kodeeritud rRNA järjestuse poolt (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Shajani *et al.*, 2011; Williamson, 2003). *In vivo* biogeneesis aitavad kõrget aktivatsioonienergiat ületada mitteribosomaalsed faktorid: SrmB, CsdA, DnaK ja DbpA. On teada, et nemad mõjutavad ribosomaalse biogeneesi *in vitro* hõlbustades rRNA voltumist (Shajani *et al.*, 2011; Iost ja Dreyfus, 2006). On näidatud, et DnaK šaperon vähendab kuumutamise etapi vajadust 30S subühiku *in vitro* rekonstruktsioonil. Võimalik, et DnaK hõlbustab RNA voltumise harutades lahti r-valgud, mille tulemusel r-valgud vabastavad RNA (Maki, Schnobrich, ja Culver 2002). Teine näide on see, et RNA helikaas DbpA interakteerub 23S rRNA spetsiifilise struktuuriga. ATP-sõltuvad helikaasid (näiteks, SrmB ja CsdA) harutavad lahti kaksikahelalisi RNA molekule, põhjustades RNA ruumilise struktuuri muutusi: ümbervoltumist (Cordin *et al.*, 2006; Fuller-Pace *et al.*, 1993; Williamson, 2003). Ekstraribosomaalsed faktorid vähendavad ebasobivate rRNA konformatsioonide arvu hõlbustades seega õige RNA struktuuri voltumist ja r-alkude - rRNA interaktsioonide moodustamist, mille kaudu vähendatakse energeetiliselt stabiilsete vaheolekute ja voltumise lõksude moodustumist (*folding trap*; Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007; Shajani *et al.*, 2011; Wilson ja Nierhaus, 2007).

2.5 Teised meetodid ribosomaalse biogeneesi uurimiseks

Mitmed biofüüsikalised meetodid on rakendatud ribosoomide biogeneesi uurimiseks. Kvantitatiivse massispektromeetria (ingl k *quantitative mass spectrometry*) abil võib täpselt määrata uuritavate osakeste massi. Seda meetodit kasutatakse ribosoomi assambleerumise uurimiseks (Chen *et al.*, 2014; Williamson, 2008). Selleks, et mõista ribosoomide täpset töömehhanismi, on oluline määrata ribosoomi struktuuri. Selleks rakendatakse kristallograafia (ingl k *crystallography*), krüoelektronmikroskoopia (ingl k *cryo-electron microscopy*) ja tuumamagnetresonants (ingl k *nuclear magnetic resonance*) meetodeid (Brunger *et al.*, 1998; Gabashvili *et al.*, 2000). Kristallograafia põhineb kristallide atomaarse struktuuri määramises röntgenkiirte difraktsiooni abil. Selle abil võib määrata nii aatomite kui nende rühmade ruumilist asendit üksteise suhtes (Brunger *et al.*, 1998). Tänapäeval kõige enam kasutatav meetod ribosoomi uurimisel on krüoelektronmikroskoopia. See on kõrge resolutsiooniga meetod, mis annab võimaluse määrata ribosoomi struktuuri ja ribosoomi siseseid interaktsioone (Diaconu *et al.*, 2005; Gabashvili *et al.*, 2000). Tuumamagnetresonantsmeetod annab võimaluse uurida kindlaid üksikuid ribosoomide komponente (Brunger *et al.*, 1998).

3. Ekstraribosomaalsed faktorid

RNA on võimeline moodustama energeetiliselt stabiilseid struktuure, kuid paljud nendest võivad olla vales konformatsioonis ning selle parandamiseks on vajalikud mitmed ekstraribosomaalsed ehk assambleerumise faktorid (Sergeeva *et al.*, 2014; Shajani *et al.*, 2011). Ribosoomi biogeneesi protsessi kaasatud ekstraribosomaalsed valgud vahendavad RNA voltumist hõlbustades energiabarjääride ületamist. Assambleerumisfaktorid on eriti olulised suurema subühiku kokkupakkimise protsessis, kuna spetsiifiliste valkude puudumine võib põhjustada vahepartiklite akumulierumist ja ribosoomide biogeneesi aeglustumist (Charollais *et al.*, 2003; Shajani *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 2007).

Ekstraribosomaalsed faktorid on jaotatavad rühmadesse funktsioonide alusel: ribosoomist sõltuvad GTPaasid, kuumašokivalgud, RNA šaperonid ja RNA helikaasid. GTPaasid on valgud, mis kasutavad GTP energiat ja omavad olulist rolli ribosoomide assambleerumises aidates kaasa valkude ja RNA voltumisele (Caldon ja March, 2003). Samuti osalevad GTPaasid rakutsükli regulatsioonis ja translatsioonis (Verstraeten *et al.*, 2011). Šaperonid osalevad ribosoomide biogeneesil hoides RNA molekule õiges konformatsioonis nii, et r-valgud võiksid seonduda õigesse seondumiskohta. Näiteks, DnaK šaperon osaleb 30S subühiku assambleerumisel seondudes 30S prekursoriga (Maki *et al.*, 2002). RNA helikaasid katalüüsivad RNA kaksikahelate lahtiharutamist (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007;

Shajani *et al.*, 2011; Wilson ja Nierhaus, 2007). *E. coli* bakterirakule iseloomulikud DEAD-*box* valkude RNA helikaasid omavad RNA-sõltuvat ATPaasset aktiivsust ning võivad käituda nagu šaperonid vahendades RNA voltumist (Mohr *et al.*, 2002; Shajani *et al.*, 2011). Näiteks, CsdA helikaas modulleerib RNA ja RNA-valk kompleksi struktuuri, hõlbustades RNA konformatsiooni muutust ja r-valkude seondumist (Iost ja Dreyfus, 2006; Phadtare, 2011).

3.1 Ribosoomi-sõltuvad GTPaasid

On teada neli *E. coli* GTPaasi, mis reguleerivad ribosoomi assambleerumist: Era (*E. coli Ras-like protein*), RsgA (*ribosome small subunit dependent GTPase A*), Der (*double-Era-like domain GTPaas*) ja ObgE (või *CgtA, Caulobacter GTP-binding protein A*).

Era (*E. coli Ras-like protein*) on 34 kDa molekulaarmassiga valk, milles on kaks N- ja C-terminaalsetes otstes paiknevat funktsionaalset domeeni (Chen *et al.*, 1999). Era GTPaas mõjutab rakutsükli ja reguleerib 30S assambleerumist seondudes 16S rRNA-le ja 30S subühikule (Sergeeva *et al.*, 2014; Verstraeten, *et al.*, 2011).

RsgA (*ribosome small subunit dependent GTPase A*) on GTPaas, mille aktiivsust stimuleeritakse 30S subühikutega või 70S ribosoomidega. On näidatud et *rsgA* geeni deletsioon võib põhjustada vabade subühikute akumulereerumist ja muutusi rakutsükli (Guo *et al.*, 2011; Sergeeva *et al.*, 2014).

Der (*double-Era-like domain GTPaas*) GTPaasi struktuuris on kaks GTPaasi domeeni (GD1 ja GD2; Hwang ja Inouye 2001) ning ta interakteerub 30S ja 50S subühikutega *in vitro* GTP juuresolekul. *Der* geeni puudumisel akumulereeruvad 23S ja 16S rRNA prekursorid, põhjustades 70S ribosoomide osakaalu vähenemist rakus (Sergeeva *et al.*, 2014; Verstraeten *et al.*, 2011).

ObgE (või *CgtA, Caulobacter GTP-binding protein A*) GTPaas seondub vabade subühikutega, interakteerudes 16S ja 23S rRNA-ga. Samuti moodustab ObgE spetsiifilise interaktsiooni L3 valguga 50S subühikus. Kuna ObgE ei seonu 70S ribosoomiga, siis arvatakse, et ta dissotseerub 50S-st enne funktsionaalse 70S moodustumist. Puhastamisel puhastub ObgE koos CsdA valguga, mis on DEAD-boxi RNA helikaas (vt. ptk 4; Jiang *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2005; Verstraeten *et al.*, 2011)

3.2 RNA šaperonid

RNA šaperonid on ekstraribosomaalsed faktorid, mis osalevad ribosoomide biogeneesis soodustades valkude voltumist. Šaperonid aitavad ületada kineetilisi lõkse (*kinetic trap*) RNA molekulide voltumise protsessis. Šaperonid harutavad lahti ja destabiliseerivad RNA struktuurid, võimaldades RNA moodustada õige struktuur (Lorsch, 2002). Kõige enam on uuritud šaperone on RbfA (*ribosome binding factor A*) ja RimM (*ribosome maturation factor M*; Soper *et al.*, 2014).

RbfA (*ribosome binding factor A*) on külmašokivalk, mis seondub 30S subühikule ja surub alla külmatundliku mutatsiooni 16S rRNAs. *RbfA* geeni puudumisel tekivad rakukasvu defektid madalatel temperatuuridel (Dammel ja Noller, 1995).

RimM (*ribosome maturation factor M*) spetsiifiliselt seondub vaba 30S subühikuga. Selle valgu geeni puudumisel akumulerevad 16S rRNA prekursorid (17S RNA) ja langeb translatsiooni efektiivsus põhjustades rakukasvu aeglustumist (Bylund *et al.*, 1998; Wilson ja Nierhaus, 2007).

RbfA šaperoni operonis kodeeritakse **RimP** valk, mis seondub 30S subühikule. RimP valgu puudumisel rakus akumulerevad 16S rRNA prekursorid ning suureneb vabade 30S ja 50S subühikue osakaal ja väheneb polüsoomide hulk (Nord *et al.*, 2009; Shajani *et al.*, 2011).

RimJ valk on külmatundlikkuse supressor, mis on seotud S5 r-valgu mutatsiooniga. Sarnaselt RimP šaperonile RimJ puudumine põhjustab 30S ja 50S alamühikute osakaalu suurenemist rakus. (Roy-Chaudhuri *et al.*, 2008; Shajani *et al.*, 2011).

KsgA šaperon reguleerib ribosomaalse biogeneesi, mõjutades 30S subühiku küpsemist. Selle geeni puudumisel rakus tekib külmatundlik fenotüüp, esinevad defektid 16S rRNAs ja aeglustub rakkude kasv temperatuuril 25°C (Formenoy *et al.*, 1994; Shajani *et al.*, 2011).

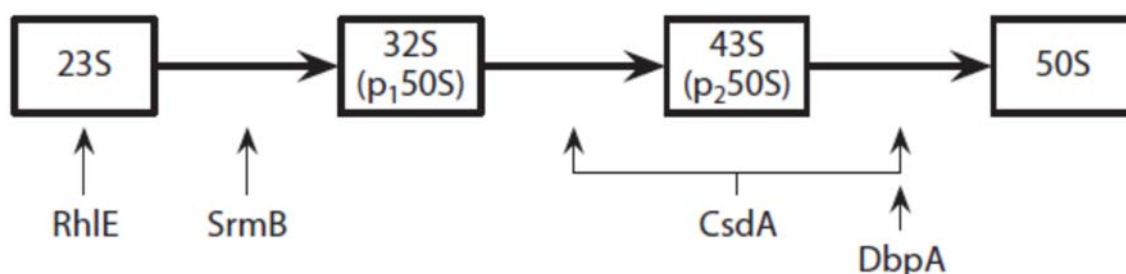
Kuumašokivalgud on šaperonid (üks rühm ekstraribosomaalsetest faktoritest), mida tarvitakse ribosomaalsete valkude voltimiseks ja kaitsmiseks. Need valgud võivad otseselt või kaudselt mõjutada ribosoomiga seonduvaid valke. Otsene toime avaldatakse S2, S6, L7/L12 ja L9 r-valkudele. Kaudselt mõjutatakse r-valkude voltumist läbi ekstraribosomaalsete faktorite (näiteks RNase E). On teada kolm ribosoomi biogeneesis osalevat kuumašokivalku: DnaK, DnaJ ja GroEL. **DnaK** seondub 30S eellaspartikliga aidates 30S subühiku assambleerumist *in vitro* madalatel temperatuuridel (Maki *et al.*, 2002). DnaK valk osaleb 30S ja 50S

assambleerumises *in vivo* temperatuuril 42°C. DnaK kuumašokivalk funktsioneerib kompleksis koos **DnaJ** šaperoniga (El Hage *et al.*, 2001; Maki *et al.*, 2002). **GroEL** šaperon ekspresseeritakse temperatuuril 45°C ja see osaleb suurema subühiku assambleerumise hilises etapis, kus 45S vahepartiklist moodustub funktsionaalne 50S subühik (El Hage *et al.*, 2001).

4. RNA helikaasid

In vivo biogeneesis aitavad kõrget aktivatsioonienergiat ületada mitteribosomaalsed faktorid. Nende hulka kuuluvad RNA helikaasid, mis harutavad lahti ribonukleinhape kaksikahelalised struktuurid ning kasutavad selleks ATP hüdroolüüsil vabanevat energiat (Cordin *et al.*, 2006). RNA helikaasid mõjutavad ribosomaalse biogeneesi *in vitro* hõlbustades rRNA voltumist (Shajani *et al.*, 2011; Iost ja Dreyfus, 2006).

RNA helikaasid on jagatud viide perekonda (SF1 - SF5), millest suurima moodustab superperekond 2 (SF2, *superfamily 2*; Cordin *et al.*, 2006). See on omakorda jaotatud alamperekondadeks. Helikaasidele on iseloomulikud ATP ja RNA-seonduvad motiivid, mis koordineerivad ATPaasset ja helikaasset aktiivsust. Suurima alamperekonna kujundab DEAD-*box*, mis esineb prokarüootsetes ja eukarüootsetes organismides. *E. coli* bakterirakus on teada viis DEAD-*box* helikaasi: CsdA (või DeaD), SrmB, DbpA, RhlB ja RhlE (Cordin *et al.*, 2006; Iost ja Dreyfus, 2006). Kõik need valgud (v.a. RhlB) osalevad RNA metabolismis ja ribosoomide biogeneesi erinevates etappides (joonis 9). RhlE ja SrmB helikaasid osalevad assambleerumise varasemas etapis. CsdA ja DbpA helikaasid vahendavad ribosoomi assambleerumist hilises etapis (Rocak ja Linder 2004).



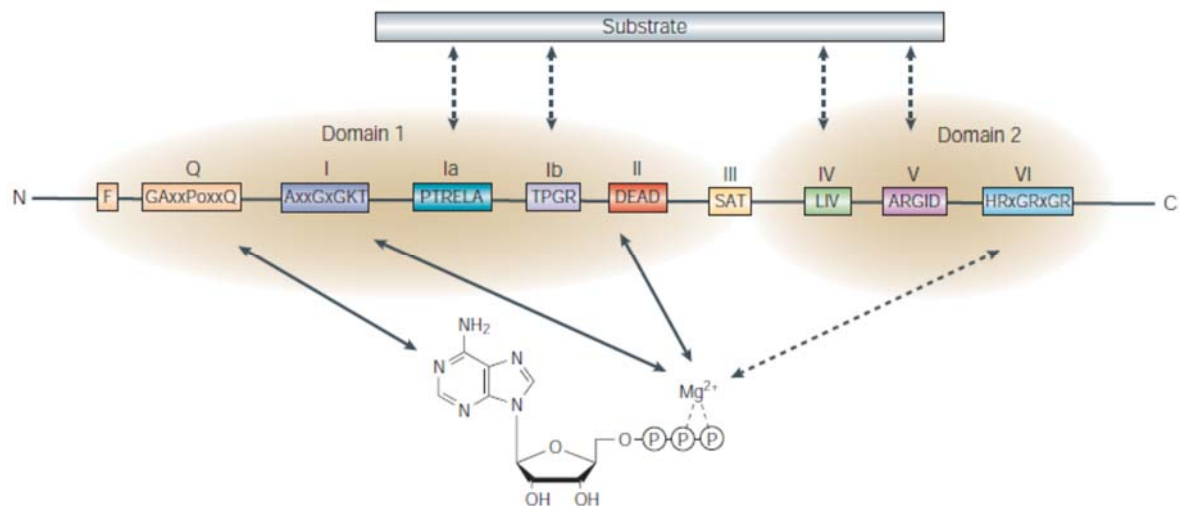
Joonis 9. Ekstraribosomaalsete faktorite (RhIE, SrmB, CsdA, DbpA) osalemine 50S assambleerumises. Nooltega on näidatud: RhIE ja SrmB osalevad varases ning CsdA ja DbpA hilises assambleerumise etapis. Joonis on kohandatud artiklist Shajani *et al.*, 2011.

4.1 DEAD-*box* RNA helikaaside struktuur

DEAD-*box* valkude struktuuris on umbes 400 aminohapet. Helikaasid koosnevad üheksast konserveerunud motiivist (Q-motiiv, motiiv I, Ia, Ib, II, III, IV, V ja VI), mis reguleerivad ATPaasset ja helikaasset aktiivsust (joonis 10; Cordin *et al.*, 2006; Rocak ja Linder, 2004; Tanner *et al.*, 2003). Kõikidele DEAD-*box* valkudele on iseloomulik DEAD-motiiv (Walker B või motiiv II), mille koostises onalaniin (Ala), glutamiin (Gln) ja kaks aspartaadi (Asp;

Cordin *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2007). DEAD-motiivis paiknev glutamiin moodustab interaktsioone ATP γ - ja β -fosfaadiga magneesiumioonide kaudu. Esimene aspartaat seob ATP-d ja osaleb selle hüdrolüüsil. Teine aspartaat tekitab vesiniksidemed seriiniga ja treoniiniga, mis on kolmanda motiivi koostisosad. ATP seondumist reguleerib Q-motiivi kõrval paiknev fenüülalaniini jääk (Linder, 2006; Rocak ja Linder, 2004; Story *et al.*, 2001). Mutatsioonid DEAD-motiivis põhjustavad ATPaasse ja helikaasse aktiivsuse vähenemist või puudust (Iost *et al.*, 1999).

DEAD-motiiv, motiiv I (või Walker A motiiv), Q-motiiv ja motiiv VI moodustavad ATP seondumiskoha ning hüdrolüüsivad seda. Motiivid Ia, Ib, III, IV ja V moodustavad interaktsioone RNA molekulidega (substraadiga).



Joonis 10. DEAD-*box* valgu järjestuse motiivid. Joonisel on illustreeritud N-terminaalne ja C-terminaalne ots. N-terminaalses otsas paikneb fenüülalaniini jääk (F). Domeenis 1 ja 2 paiknevad motiivid, mille seas on ka DEAD-*box* helikaasidele iseloomulik DEAD-motiiv (II). Motiivid Q, I, II ja VI seonduvad ATP molekuliga. Valgud seonduvad substraatidega Ia, Ib, IV ja V motiivide kaudu. Joonis on kohandatud artiklist (Rocak ja Linder, 2004).

4.2 DEAD-*box* valkude funktsionaalne iseloomustus

4.2.1 RNA-sõltuv ATPaasne aktiivsus

DEAD-*box* valkudele on iseloomulik RNA-sõltuv ATPaasne aktiivsus. Näiteks DbpA DEAD-*box* helikaasi ATP hüdroolüüs toimub spetsiifilise RNA toimel (Tsu *et al.*, 2001). Samas on teada et DEAD-*box* valgud võivad hüdroolüüsida ATP-d RNA-st sõltumatult (Bizebard *et al.*, 2004). Mõnede DEAD-*box* valkude nõrk ATPaasne aktiivsus võib olla põhjustatud sisemisest katalüütilisest aktiivsusest või substraatide puudusest. Teistel juhtudel mittespetsiifilise RNA substraadi puudumine võib kutsuda esile madala ATPaasse aktiivsuse (Fuller-Pace *et al.*, 1993; Rocak ja Linder, 2004).

4.2.2 Lahtiharutamise aktiivsus (*unwinding activity*)

DEAD-*box* valgud on RNA helikaasid, mis katalüüsivad kaksikahelaliste RNA molekulide lahtiharutamist energiast sõltuval viisil ehk kasutavad selleks ATP hüdroolüüsil vabanevat energiat. ATP kasutatakse selleks, et remodelleerida RNA ja RNA-valgu komplekse (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Bizebard ja Ferlenghi (2004) hüpoteesi kohaselt DEAD-*box* valkude ATPaasne aktiivsus sõltub RNA substraatidest. Bizebard *et al.* (2004) arvates helikaaside aktiivsus võib olla mõjutatud RNA pikkusest, mitte selle struktuurist (kaksikahelaline või üheaahelaline; Bizebard *et al.*, 2004). CsdA, SrmB valkude aktiivsus on stimuleeritud pika RNA-ga. Ainult RhlE on stimuleeritav nii pikkade kui ka lühikeste oligonukleotiidide poolt. Need valgud on võimelised lahtiharutama RNA-d, millel on pikad üheaahelalised otsad ja ainult RhlE on võimeline lahti harutama RNA-d, millel on kaksikahelalised otsad. Lühikesed oligonukleotiidid ei stimuleeri SrmB ja CsdA helikaaside aktiivsust. Ainult dsRNA, millel on pikad üheaahelalised otsad võib olla lahti harutatud SrmB ja CsdA helikaaside poolt (Bizebard *et al.*, 2004; Cordin *et al.*, 2006; Linder, 2006).

4.3 *E. coli* DEAD-*box* RNA helikaasid

SrmB on esimene tuvastatud DEAD-*box* perekonna helikaas. SrmB on kaasatud 50S subühiku varasema etapi assambleerumisse (Bizebard *et al.*, 2004; Charollais *et al.*, 2003). *SrmB* geeni puudumine põhjustab aeglast rakukasvu madalamatel temperatuuridel (alla 30°C) ning sellega kaasneb 70S ribosoomide osakaalu vähenemine bakterirakus. SrmB valgu defitsiidil vabade subühikute arv on kõrgem ning tekivad vahepartiklid, mis sedimenteeruvad 40S juures. SrmB valk seondub 40S vahepartiklile, millel on vähenenud järgmiste r-valkude tasakaal: L6, L7/L12, L14, L16, L25, L27, L31, L32, L33 ja on puudu L13, L28 ja L34 r-

valgud (Charollais *et al.*, 2003). Kuna 40S vahepartiklis puuduv L13 ribosomaalne valk on hädavajalik 50S subühiku *in vitro* assambleerumise esimeses etapis, siis arvatakse, et SrmB helikaas osaleb ribosoomi biogeneesi varasemates etappides (Spillmann *et al.*, 1977; Trubetskoy *et al.*, 2009). SrmB DEAD-*box* helikaas omab RNA-sõltuvat ATPaasset aktiivsust ja nõrka helikaasset aktiivsust *in vitro* (Bizebard *et al.*, 2004; Kossen *et al.*, 2002).

DbpA on DEAD-*box* perekonda kuuluv ATP-sõltuv RNA helikaas, mis spetsiifiliselt seondub 23S rRNA linguga 92 (*stem-loop* 92; Sharpe Elles *et al.*, 2009; Zhao ja Jain 2011). See struktuur on osa ribosoomi aktiivtsentrist, kus toimub peptiidsideme süntees. DbpA valgu C-terminaalses otsas on RNA äratundmis motiiv (*recognition motif*), mis moodustab spetsifilise interaktsioone linguga 92 23S rRNA-s (Fuller-Pace *et al.*, 1993; Nicol ja Fuller-Pace 1995). N-terminaalses otsas on kaks Rec-sarnast domeeni, mille vahel tekib ATP seondumiskoht. Selle domeeni abil seondub DbpA mittespetsiifiliselt RNA-ga (Karginov *et al.*, 2005). DbpA valgu ATPaasne aktiivsus stimuleeritakse 23S rRNA spetsiifilise struktuuri (link 92) juuresolekul. DbpA valgu puudumisel rakkude kasvukiirus ei muutu võrreldes metsiktüüpiga ning ribosoomi profiilides ei esine defekte (Sharpe Elles *et al.*, 2009). DbpA seondub kõikidega rRNA-ga, kuid ATPaasse aktiivsuse stimuleerib ainult 23S rRNA (Böddeker *et al.*, 1997).

RhlB on 47 kDa molekulaarmassiga helikaas, mis on RNA degradosoomi komponent. Interakteerub ribonukleaasidega: Rnase E ja polünukleotiidi fosforülaas, mis koos teiste valkudega kuuluvad degradosoomi kompleksi (Bizebard *et al.*, 2004; Pietras *et al.*, 2013). Interaktsioon RNase E nukleaasiga tõstab RhlB helikaasi ATP-sõltuva aktiivsuse. RNA degradosoomi koostises aitab RhlB kaasa mRNA lagundamisele ja RNA küpsemisele (Carpousis, 2007).

RhlE helikaas on kõige vähem uuritud valk DEAD-*box* perekonnast. Kuigi on teada, et see on ribosoomiga assotsieerunud valk, mis moduleerib CsdA ja SrmB valkude funktsioone bakterirakus (Bizebard *et al.*, 2004; Jain, 2008; Rogers *et al.*, 2001). Lisaks RhlE helikaas taastab CsdA ja SrmB valkude poolt põhjustatud ribosoomi biogeneesi aeglustumist (Jain, 2008).

4.4 CsdA RNA helikaas

CsdA (*cold-shock DEAD-box protein A* või DeaD) on DEAD-box perekonda kuuluv RNA helikaas molekulaarmassiga 70 kDa (Jones *et al.*, 1996). CsdA nime sai helikaas aastal 1991 Brandi *et al.*, poolt, (varem see oli tuntud DeaD valguna (Brandi *et al.*, 1999; Peil *et al.*, 2008). CsdA helikaas on kaksikahelalist RNA-d lahtiharutav ensüüm, mis on kodeeritud *csdA* geeni poolt. See on külmašokivalk, mis ekspresseerub madalatel temperatuuridel (alla 30°C; Iost *et al.*, 2013).

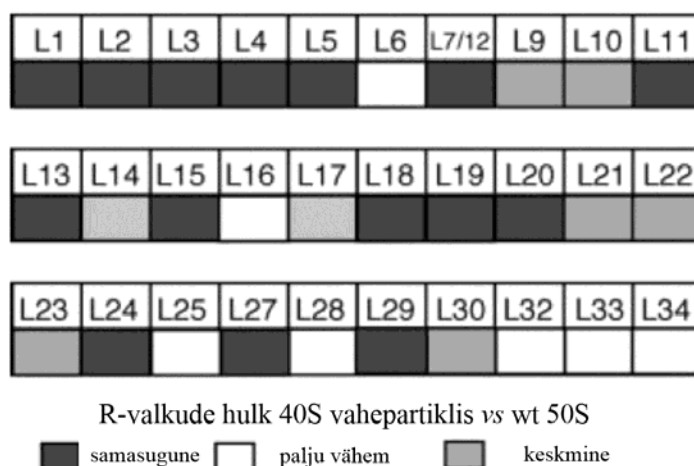
CsdA helikaas osaleb mitmetes ribosoomi biogeneesi protsessides: translatsioonis, RNA degradatsioonis ja ribosoomi assambleerumises (Charollais *et al.*, 2004; Moll *et al.*, 2002; Prud'homme-Généreux *et al.*, 2004). Katkestused ja mutatsioonid *csdA* geenis põhjustavad rakukasvu fenotüübi defektid madalatel temperatuuridel (Peil *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 1996).

4.4.1 Vahepartiklite iseloomustamine

CsdA geeni puudumisel rakkudes temperatuuril 37°C suureneb 30S subühikute osakaal ja väheneb 50S subühikute kogus. Madalatel temperatuuridel akumul eeruvad vahepartiklid, mille sedimentatsioonikoefitsient on 40S (Jones *et al.*, 1996; Peil *et al.*, 2008). Vahepartiklid on funktsionaalse 50S subühiku derivaadid, kuna sisaldavad 23S rRNA-d (Charollais *et al.*, 2004; Peil *et al.*, 2008).

Tekkivate vahepartiklite iseloomustamiseks Peil *et al.* (2008) analüüsisid rRNA sisaldust ribosoomides (Peil *et al.*, 2008). Metsiktüüpi 70S ribosoomid sisaldavad küpse 23S rRNA ja 16S rRNA; 30S subühiku eellastel on 23S rRNA, mis 5'-otsast on viis või seitse nukleotiidi pikem, kui küps 23S rRNA. (Bram *et al.*, 1980; Sirdeshmukh ja Schlessinger, 1985). Lähtuvalt sellest, 40S vahepartiklid kui suurema subühiku eellased peavad sisaldama küpsemata 23S rRNA. 50S subühiku degradeerimisproduktis peab olema küps 23S rRNA. Tulemused näitasid, et *csdA* geeni deletsioonil moodustunud 40S vahepartiklid sisaldavad 23S rRNA prekursorit, millel on seitse või kolm nukleotiidi rohkem 5' otsas ja lisaks sellele on ka väike kogus küpseid 23S rRNA-d. Toetades sellele võib arvata, et 40S vahepartiklid on 50S subühiku eellased, mitte degradeerimisprodukt (Charollais *et al.*, 2004; Peil *et al.*, 2008). Pulssmärgimise meetoodika alusel vaadeldi ribosoomide assambleerumist ajas ning saadud tulemused kinnitasid varem saadud andmed: 40S vaheühendid on 50S subühiku eellasparkiklid ja akumul eeruvad eelkõige 50S biogeneesi aeglustamise tõttu (Charollais *et al.*, 2004; Peil *et al.*, 2008).

CsdA on seostunud 50S prekursoriga. 40S partiklid on inaktiivsed, kuid nendest saavad funktsionaalsed 50S ribosoomid (Peil *et al.*, 2008). 40S ehk pre-50S vahepartiklid sisaldavad endas kõiki ribosomaalseid valke, kuid nende osakaal erineb metsiktüüpi ribosoomidest (joonis 11; Charollais *et al.*, 2004). Kui võrrelda metsiktüüpi 50S subühikut 40S vahepartikliga siis on näha et vähenenud on järgmiste r-valkude sisaldus: L6, L9, L10, L14, L16, L17, L21 – L24, L25, L28, L30 – L34 (Charollais *et al.*, 2004).



Joonis 11. R-valkude hulk 40S vahepartiklites *versus* metsiktüüpi 50S subühikutes. Tumehall, hall ja valged kastid illustreerivad valkude osakaalu muutust 40S vahepartiklites. Tumehall – valkude tase on samasugune (L1-L5, L7/L12, L11, L13, L15, L18 – L20, L24, L27, L29); helehall – valke esineb natuke vähem (L9, L10, L14, L17, L21 – L23, L30); valge – valke 40S vahepartiklis on palju vähem, kui 50S subühikus (L6, L16, L25, L28, L32 – L34). Joonis on kohandatud artiklist Charollais *et al.*, (2004).

4.4.2 CsdA helikaasi ensümaatilise aktiivsuse

CsdA helikaas omab *E. coli* rakus ATPaasset ja helikaasset aktiivsust (Cordin *et al.*, 2006). Vastavalt Bizebard *et al.* (2004) hüpoteesile on CsdA valgu ATPaasne aktiivsus stimuleeritav erinevate RNA molekulide poolt. Samal ajal on Rocak ja Linder (2004) näidanud, et ATP hüdroolüüs ei vaja spetsiifiliste RNA substraatide olemasolu (Rocak ja Linder, 2004). On teada, et CsdA helikaas on võimeline harutama lahti RNA ja RNA-valgu struktuure (Bizebard *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2007). Sarnaselt teistele DEAD-box valkudele CsdA helikaas on võimeline dissotseerida lühikesi RNA duplekse, kasutades selleks ATP hüdroolüüsil vabanevat energiat (Turner *et al.*, 2007). Arvatakse, et DEAD-box valkude helikaasne aktiivsus on vajalik selleks, et aidata kaasa ribosoomide assambleerumisele (Iost *et al.*, 2013; Iost ja Dreyfus, 2006). Antud töö eksperimentaalses osas keskendutakse küsimusele, kas ribosoomid

või assambleerumise vaheproduktid on võimelised stimuleerima CsdA valguga ATPaasset aktiivsust ning mis on CsdA märklauaks *in vivo*.

Bakalaureusetöö tulemustest järeldus, et *E. coli* metsiktüüpi suurem subühik hüdrolyüsib ATP samaväärselt CsdA valguga. See tähendab, et CsdA helikaasi ATP hüdrolyüs toimub 50S subühikust sõltumatult ja selle subühiku juures esineb mittespetsiifiline ATP hüdrolyüs. Kirjandusest selgus, et kõrget ATPaasset aktiivsust põhjustab RbbA (*ribosomal binding ATPase*) - ribosoomiga seondunud valk, mille molekulaarmass on 91 kDa. RbbA valguga N-terminaalses otsas on kaks ATP-seonduvat domeeni ja üks RNA-seondumismotiiv (Ganoza ja Kiel 2001; Kiel et al., 1999). RbbA moodustab interaktsioone 16S rRNA-ga ja S1 r-valguga, mille kaudu seondub 30S subühikuga ja 70S ribosoomiga (Ganoza ja Kiel 2001). RbbA valk omab ribosoomi-sõltuvat ATPaasset aktiivsust (Kiel et al., 1999). Kiel et al. (1999) näitasid, et *E. coli* 70S ribosoomid stimuleerivad RbbA valguga ATPaasset aktiivsust (Kiel et al., 1999). RbbA valguga ribosoomi-sõltuv ATP hüdrolyüs on vajalik valkude sünteesi stimuleerimiseks (Kiel ja Ganoza 2001).

4.4.3 Teised CsdA helikaasi funktsioonid

CsdA geen surub alla mutatsiooni *rspB* geenis, mis kodeerib r-valku S2 (Toone et al., 1991). Lähtuvalt sellest arvatakse, et CsdA võib osaleda väiksema subühiku biogeneesis. CsdA ülekspressioon taastab r-valkude S2 ja S1 lülitamise ribosoomi koosseisu rakkudes, kus S2 r-valk on mutantne (Moll et al., 2002). CsdA abistab translatsiooni: *in vitro* katsed näitavad, et CsdA osaleb mRNA translatsiooni initsiatsioonis (Lu et al., 1999). Lisaks sellele CsdA võib olla kaasatud mRNA stabiliseerimisse ja degradeerimisse (Yamanaka ja Inouye, 2001).

EKSPERIMENTAALNE OSA

1. Töö eesmärk

Käesoleva magistritöö keskendub *E. coli* RNA helikaasi CsdA rollile ribosoomide biogeneesis. Töö põhieesmärk on selgitada välja millised ribosoomi partiklid või biogeneesi vaheproduktid on CsdA helikaasi substraatideks. Selleks analüüsiti erinevate ribosoomipartiklite võimet stimuleerida CsdA valgu ATPaasset aktiivsust.

Eksperimentaalne töö jagunes järgnevateks etappideks:

1. CsdA valgu ATPaasse aktiivsuse analüüs
2. *E. coli* MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ tüve konstrueerimine ja iseloomustamine
3. CsdA ATPaasset aktiivsust stimuleerivate ribosoomipartiklite identifitseerimine

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1 Bakteritüved ja plasmiid

Töös kasutati järgmisi *E. coli* tüvesid:

Tabel 1. *E. coli* tüvede genotüübid

Tüve nimi	Genotüüp	Allikas
MG1655	F ⁻ , λ - <i>ilvG-rfb-50 rph-1</i>	Blattner <i>et al.</i> , 1997
MG Δ <i>csdA</i> (JW5531-1)	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ ⁻ , Δ <i>deaD</i> 774:: <i>kan,rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Baba <i>et al.</i> , 2006
MG Δ <i>rbbA</i> (JW5676-1)	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ ⁻ , Δ <i>rbbA</i> 741:: <i>kan,rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Baba <i>et al.</i> , 2006
MG Δ <i>rbbA</i> Δ <i>csdA</i>	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ ⁻ , Δ <i>deaD</i> , Δ <i>rbbA</i> 741:: <i>kan,rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Käesolev töö

E. coli tüvede konstrueerimiseks kasutati plasmid *pCP20* (FLP⁺, λ I857⁺, λ *p_R*, Rep^{ts}, Amp^R, Cam^R) (Cherepanov ja Wackernagel, 1995, Datsenko ja Wanner, 2000).

Transduktsiooni läbiviimiseks kasutati bakteriofaagi P1 (Sternberg, 1990).

2.2 Söötmed

Escherichia coli bakterite kasvatamiseks säilituskultuurist kasutati Luria-Bertani (LB) agarsöödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar) (Bertani, 1951) ning 2xYT vedelsöödet (1,6% trüpton; 1% pärmiekstrakt; 0,5% NaCl) (Sambrook ja Russell, 2001). Söötmetele lisati vajadusel vastavalt bakteritüve resistentsusele antibiootikumi kanamütsiin (Km) lõppkontsentratsioonis 25 µg/ml. FLP rekominatsioon viidi läbi LB-Amp tardsöötmel ampitsilliini (Amp) lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml.

2.3 Puhvrid

1 x TBE puhver (750mM Tris HCl pH 8.8, 200mM NH₂SO₄, 0,1% triton 100, 5% ficoll 400, 10 mM tartasiin)

Adsorptsioonilahus ehk STOP puhver (0,01 M aktiivsüsi NORITA; 2 mM KH₂PO₄; 0,036% (w/v) HCl)

ATPaasse katse puhver AP-2 (30 mM Tris (pH=7,5); 100 mM KCl; 1 mM DTT; 5 mM MgOAc)

Lüüsipuhver (20 mM Tris (pH=7,5); 100 mM NH₄Cl; 10 mM MgOAc, 16% (w/v) sahharoos; 6 mM β-merkaptotoetanool)

OV-10 puhver (20 mM Tris (pH=7,5); 100 mM NH₄Cl; 10 mM MgOAc; 6 mM β-merkaptotoetanool)

OV-10/1000 (20 mM Tris (pH=7,5); 1 M NH₄Cl; 20 mM MgOAc; 6 mM β-merkaptotoetanool)

Puhver RF 1 (1,2% RbCl, 0,99% MnCl₂·4H₂O, 0,15% CaCl₂·2H₂O, 30mM KAc (pH=7,5), 10,5% glütserool)

Puhver RF 2 (10mM MOPS, 0,12% RbCl, 1,1% CaCl₂·2H₂O, 15% glütserool)

Tris-SDS puhver (10 mM Tris (pH=7,5); 1,1% SDS; 1 mM EDTA; 0,1 M NaCl)

2.4 Ensüümid ja kemikaalid

Kasutatud kemikaalid olid firmadelt „Sigma-Aldrich“, „AppliChem“, „Amresco“. Ensüümid Dnase I ja lüsotsüüm olid „Amresco“ firmalt ja [γ-³²P]-ATP „Perkin-Elmer“ firmalt.

2.5 Aparatuur

Vedelkultuure inkubeeriti HT INFORS loksutis (loksuti kiirus 180 rpm) ja tardsöötmeid Heraeus ja Sanyo inkubaatorites. Kultuuride ja lahuste optilised tihedused mõõdeti Eppendorf Bio Photometer spektrofotomeetriga. Lauatsentrifuugidest kasutati Biofuge Heraeus fresco ja Hettich Rotina 420R tsentrifuugi. Lüsfaat segati BIO-SAN „end-over-end“ segajal ning rakkude lüüsiks kasutati PrecellysTM Control Device homogenisaatorit. Ribosoomide fraktsioneerimiseks kasutati Beckman Coulter L-90K ultratsentrifuugi (rootor SW-28 ja Ti-50) ning Beckman OPTIMA-XP lauaultratsentrifuugi. Proovides sisalduva nukleiinhappe fraktsioineerimisel ja visualiseerimisel kasutati läbivoolu-spektromeetrit UV900, peristaatilist pumpa P1 ja isekirjutajat Recorder 112 abil (kõik GE Healthcare). ATPaasse katse viimiseks kasutati Biosan CH-100 termostaati, proovide segamiseks Fisher Vortex

Genie 2 ja Eppendorf Mixer 5432 segajad. Radioaktiivsuse loendamiseks kasutati Perkin Elmer Tri-Carb 2800 TR radioaktiivsuse loendajat.

2.6 *E. coli* MG $\Delta rbbA$ $\Delta csdA$ tüve konstrueerimine

2.6.1 Transformatsioon ja plasmidi eemaldamine

LB+Km (25 μ g/ml) tardsöötmetelt inokuleeriti kahes korduses üks *E. coli* JW5676-1 ($\Delta rbbA::Km$) või JW5531-1 ($\Delta csdA::Km$) koloonia 2 ml 2xYT vedelsöötmesse ning inkubeeriti loksutis 37°C juures kuni OD₆₀₀ \approx 0,8. Seejärel jahutati rakud jääl 15-30 minutit ning koguti lauafuugiga 4000 rpm 4 minutit 4°C juures. Rakkudelt eemaldati sööde, suspendeeriti 2 ml puhvris RF1 ja inkubeeriti jääl 15-20 minutit. Rakud fuugiti uuesti (4000 rpm, 4 min, 4°C), eemaldati supernatant ning suspendeeriti 500 μ l puhvris RF2. Kompetentsetele rakkudele lisati plasmidi pCP20 (c=19 mg/ml). Transformeerimine viidi läbi kuumašoki meetodil. Rakke hoiti 20 minutit jääl ning seejärel 5 minut 30°C juures. Rakkudele lisati 1 ml 2xYT söödet ning turgutati 1h 37°C juures. Transformeeritud rakud koguti kokku lauafuugiga 4000 rpm 5 minutit, suspendeeriti 100 μ l 2xYT vedelsöötmes, FLP rekombinatsioon viidi läbi LB+Amp (100 μ g/ml) tardsöötmetel üleöö 30°C juures.

pCP20 eemaldamiseks rakkudest inokuleeriti LB+Amp (100 μ g/ml) tardsöötmetelt kahes korduses üks *E. coli* koloonia [JW5676-1 ($\Delta rbbA$, *pCP20*) või JW5531-1 ($\Delta csdA$, *pCP20*)] ning külvati paralleelselt nii LB ja LB+Amp (100 μ g/ml) tardsöötmele. Rakke inkubeeriti kuumakapis 37°C juures üleöö. Õnnestunud transduktsiooni, transformatsiooni ja plasmidi eemaldamise järel moodustusid *E. coli* kolooniad ainult LB tardsöötmetel.

2.6.2 PCR

PCRi läbiviimiseks kahes korduses lüüsi üks *E. coli* koloonia 10 μ l destilleeritud vees 10 minuti jooksul 95°C juures. Proovile lisati 15 μ l reaktsioonisegu. Reaktsioonisekus kasutati 10x PCR puhvrit, 2 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl₂, nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) lõppkontsentratsiooniga 0,2 mM, termoresistentset *Thermus aquaticus*'e Taq DNA polümeraasi lõppkontsentratsiooniga 0,2 U/ μ l ning 15 pmol praimerit (*direct* ja *reverse*). PCR programmi etapid olid järgmised:

- | | |
|---|-----------|
| 1) Algne denaturatsioon (94°C, 3 min) – 1 tsükkel | |
| 2) Denaturatsioon (94°C, 20 sek) | } 3tsükli |
| 3) Praimerite seondumine (56°C, 30 sek) | |
| 4) Elongatsioon (72°, 2 min) | |

5) Lõplik elongatsioon (72°C, 7 min) – 1 tsükkel

2.6.3 Bakteriofaag P1 viiruslüsaadi valmistamine

LB tardsöötmetelt inokuleeriti üks *E. coli* MG1655 koloonia 2xYT vedelsöötmesse ruumalas 2ml. Üleöö kultuurist valmistati 10-kordne lahjendus söötmesse 2xYT ruumalaga 2 ml ja transduktsiooni efektiivsuse tõstmiseks lisati CaCl₂ (lõppkontsentratsiooniga 5mM). Kultuuri inkubeeriti loksutis 37°C kuni optilise tiheduseni 0,8 ühe tunni jooksul ja nakatati 100µl-i bakteriofaag P1 lahusega (viirustiiter ~1x10⁸ pfu/ml). Seejärel inkubeeriti rakke 4 – 5 h loksutis 37°C juures ning moodustunud viiruspartiklid eraldati kloroform meetodil. Bakteriofaagiga P1 nakatatud *E. coli* rakkudele lisati kloroform lõppkontsentratsiooniga 10% - 15%. Rakkude lüüsumise efektiivsuse tõstmiseks segati kultuuri Vortexiga. Lüüsunud rakud sadestati lauatsentrifuugiga 13000 rpm 3 minutit. Supernatant eraldati uude tuubi ning töötlust kloroformiga korraldati. Saadud viiruslüsaati säilitati 4°C juures.

2.6.4 Doonortüvede nakatamine bakteriofaagiga P1 ja viiruslüsaadi valmistamine

LB tardsöötmetelt inokuleeriti kahes korduses üks *E. coli* tüvi (JW5676-1, JW5531-1) 2 ml 2YT vedelsöötmesse. Üleöö kultuuridest tehti 10x lahjendused 2 ml 2xYT vedelsöötmesse, millele lisati CaCl₂ lõppkontsentratsiooniga 5 mM ja rakke inkubeeriti loksutis kuni optilise tiheduseni (A₆₀₀) 1,1-1,2. Seejärel lisati ühele kultuurile 100 µl värsket bakteriofaag P1 (MG1655) lahust ning kultuure inkubeeriti loksutis 4 – 5 tundi. Viiruspartiklid eraldati rakkudest kloroform meetodiga. Valmistatud bakteriofaagide P1 (JW5676-1, *ΔrbbA*), P1 (JW5531-1, *ΔcsdA*) lüsaadid kasutati kohe katsetes ning edaspidiseks ei talletatud.

2.6.5 Bakteriofaag P1 eraldamine kloroform meetodiga

Bakteriofaag P1-ga nakatatud *Escherichia coli* kultuurile lisati kloroform (lõppkontsentratsioon 10% ja lüüsiefektiivsuse tõstmiseks segati kultuuri intensiivselt. Lüüsunud rakud sadestati lauatsentrifuugis (13krpm, 30s) ning eraldati viiruspartiklitega vesifaas kloroformist. Saadud bakteriofaag P1 lahusega korraldati kloroform eraldust.

2.6.6 Transduktsioon

Retsipienttüve ettevalmistamiseks inokuleeriti kahes korduses üks *E. coli* koloonia MG1655, JW5676-1 (*ΔrbbA*), JW5531-1 (*ΔcsdA*) üleöö 2 ml 2xYT vedelsöötmes. Üleöö kultuurist tehti 40-kordne lahjendus 2 ml 2xYT vedelsöötmesse ning kultuuri inkubeeriti loksutis kuni

optilise tiheduseni (A_{600}) ≈ 2 . Seejärel fuugiti rakud 4000 rpm juures 5 minutit, eemaldati supernatant ja rakke suspendeeriti 500 μ l 2xYTs koos 10 mM CaCl_2 . Retsipienttöve nakatamiseks lisati 100 μ l-le kultuurile järgmise skeemi alusel valmistatud P1 viiruslüsäati ja/või 2xYT vedelsöödet.

Peale retsipienttöve nakatamise algust inkubeeriti rakke loksutamata 37°C juures 30 minutit. Viirusinkubatsioon peatati naatriumtsitraatiga (lõppkontsentratsioon 1M pH 5,5). Seejärel lisati rakkudele 1 ml 2xYT söödet ning inkubeeriti 37°C juures ühe tunni jooksul. Pärast inkubatsiooni fuugiti rakke lauafuugiga 4000 rpm juures 5 minutit ja rakkude sadet pesti kaks korda 1 ml 2xYT söötmega. Rakud suspendeeriti 100 μ l 2xYT söötmes, millele lisati naatriumtsitraati lõppkontsentratsiooniga 100 mM ja pH 5,5. Rakud külvati LB+Km (25 μ g/ml) tardsöötmele ja inkubeeriti kuumakapis 37°C juures üleöö. Õnnestunud transduktsiooni, transformatsiooni ja plasmidi eemaldamise järel moodustusid *E. coli* kolooniad ainult LB tardsöötmele. Geenide puudumist kontrolliti PCR-i ja sekveneerimise abil.

2.7 Rakulüsäadi valmistamine ja ribosoomide fraktsioneerimine

LB tardsöötmele inokuleeriti *Escherichia coli* JW5676-1 (*Arbba*) ja MG *Arbba* *AcstdA* kolooniad 2 ml 2xYT vedelsöötmesse (kuhu lisati kanamütsiin lõppkontsentratsiooniga 25 μ g/ml), mida kasvatati üleöö loksutis 37°C juures. Üleöö kultuuridest tehti kahesaja kordsed lahjendused ning kultuurid (koguses 2 liitrit) kasvatati 37°C või 18°C juures kuni optilise tiheduseni 1,5 (A_{600}).

Rakud koguti tsentrifuugides 6000 rpm, 15 min, 4°C ja resuspendeeriti 3 ml lüüsipuhvris. Rakukestade lõhkumiseks lisati lüütsüüm (lõppkontsentratsioon 1 mg/ml) ja DNA lagundamiseks DNase I (lõppkontsentratsioon 40 U/ml). Lüsäati segati BIO-SAN „end-over-end“ segajal 30 min, 4°C juures, lisati 500 ml klaasliiva 2 ml lüüsisegu kohta ning homogeniseeriti PRECELL homogenisaatoris (6000 rpm, 3 x 60 s tsükkel). Membraankromosomaalse kompleksi sadestamiseks tsentrifuugiti proove lauatsentrifuugis 13 krpm, 20 min, 4°C. Supernatanti optilist tihedust mõõdeti lainepikkusel 260 nm.

Ribosoomi partiklite eraldamiseks laeti 15% - 30% sahharoosi gradiendile kuni 120 ekvivalentühikut (A_{260}) rakulüsäati ja ultratsentrifuugiti SW28 rootoris $\omega^2t=3,02 \times 10^{11}$ $\text{rad}^2 \cdot \text{s}$, 4°C juures. MG *Arbba* töve 70S ribosoomid dissotseerimiseks laeti 10% - 25% sahharoosi gradiendile kuni 120 ekvivalentühikut (A_{260}) rakulüsäati ja ultratsentrifuugiti SW28 rootoris $\omega^2t=3,02 \times 10^{11}$ $\text{rad}^2 \cdot \text{s}$, 4°C juures. Ribosoomide fraktsioonid visualiseeriti

läbivoolu-spekrofotomeetri ($A_{260\text{nm}}$), peristaatilise pumba ja isekirjutaja abil. Sahharoosi gradiendist koguti 70S, 50S, 30S subühikute ja pre-50S partiklite fraktsioonid. Ribosoomide puhvri vahetamiseks ja kontsentreerimiseks kasutati ultrafiltratsioonifiltrit (Pierce Concentrator 20 ml/150K MWCO poori suurusega). Kontsentreerimiseks kasutati lauatsentrifuugiti ROTINA ja tsentrifuugiti vastavalt tootja poolt ettenähtud tingimustele 4°C juures 4500 rpm. Ribosoomide optilised tihedused mõõdeti lainepikkusel 260 nm, proovid külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C juures.

2.8 Ribosoomide soolaga „pesemine“

Kuni 50 ekvivalentsete ribosoomide ühikutele (A_{260}) (MG *ΔrbbA* 50S, 30S) lisati koorimispuhvrit ja inkubeeriti 10 min 40°C juures (ribosoomide kogused ja kontsentratsioonid on toodud tabelis 3). 50S subühiku R-valkude „koorimiseks“ lisati 2 M LiCl ja 30S subühikutele 1M LiCl ning segati „end-over-end“ segajal, üleöö, 4°C juures. Ribosoomid koguti tsentrifuugimisega 200000 g, 2 h (Beckman OPTIMA-XP lauaultratsentrifuugis). Supernatandist sadestati valgud atsetoonisga (1:4) ning säilitati -80°C juures. Kooritud ribosoomide sadet pesti 500 µl OV-puhvriga ja lahustati 50 µl-s OV-10 puhvris. Lahustamatute partiklite sadestamiseks tsentrifuugiti proove lauatsentrifuugis 13 krpm, 30 min, 4°C juures. Ribosoomi subühikute optilised tihedused mõõdeti lainepikkusel 260 nm, külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C juures.

2.9 CsdA valgu ATPaase aktiivsuse test

CsdA valgu ATPaase analüüsi test viidi läbi puhvris AP-2 (30 mM Tris pH=7,5; 100 mM KCl; 1 mM DTT; 5 mM MgOAc). CsdA valku eelinkubeeriti stimuleeriva substraadiga 5 min jooksul 25°C juures. Lahusesse lisatu radioaktiivse ATP lõppkontsentratsiooniga 2 mM ja [γ - ^{32}P]-ATP segu nii, et eriaktiivsus jääks vahemikku 9 – 12 DPM/pmol. Reaktsioon peatati 150 µl STOP lahusega (adsorptsioonilahus) ajapunktidel 1 min, 5 min, 10 min ja 30 min. Proove segati vääristajal 10 min ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga 13 krpm, 4°C juures, 5 min. 100 µl supernatanti tõsteti uude tuubi, kuhu lisati 150 µl adsorptsiooni lahust korduvaks adsorbeerimiseks ning protseduuri korrati, mille järel loendati 150 µl-s supernatandis sisalduv radioaktiivsus kasutades radioaktiivsuse loendajaga Tricarb2800.

Kõik katseseeriad koosnesid neljast reaktsioonivariandist, mis sisaldasid järgnevaid komponente:

- 1) variant 1 – substraat (vaata tabel 3), AP-2 puhver, 2 mM ATP/[γ - 32 P]-ATP
- 2) variant 2 – substraat (vaata tabel 3), CsdA valk (7 pmol), AP-2 puhver, 2 mM ATP, [γ - 32 P]-ATP
- 3) variant 3 – CsdA valk (7 pmol), AP-2 puhver, 2 mM ATP, [γ - 32 P]-ATP
- 4) variant 4 (katse foon) – AP-2 puhver, 2 mM ATP, [γ - 32 P]-ATP

CsdA ATPasse aktiivsuse stimulatsiooni uurimiseks kasutatud substraadid on toodud tabelis 1.

Tabel 2. Substraadid ja nende kontsentratsioonid.

Substraat	Kontsentratsioon katsepunkti kohta ¹
tRNA (73 - 94 nt)	352 pmol/ μ l
MG1655 70S ²	14 pmol/2 μ l
MG1655 50S	16 pmol/2 μ l
Δ rbbA 70S ³	14 pmol/2 μ l
Δ rbbA 50S	5,8 pmol/1 μ l
Δ rbbA 30S	6,5 pmol/1 μ l
Δ rbbA K-50S ⁴	5 pmol/1 μ l
Δ rbbA K-30S	6 pmol/1 μ l
Δ rbbA Δ csdA pre-50S ⁵	6 pmol/1 μ l
Δ rbbA Δ csdA 30S	6 pmol/2 μ l

¹ substraati kontsentratsioon iga ajapunkti kohta (1 min, 5 min, 10 min ja 30 min)

² MG1655 – ribosoomid *E. coli* MG1655 tüvest

³ Δ rbbA – ribosoomid tüvest *E. coli* JW5676-1 (Δ rbbA)

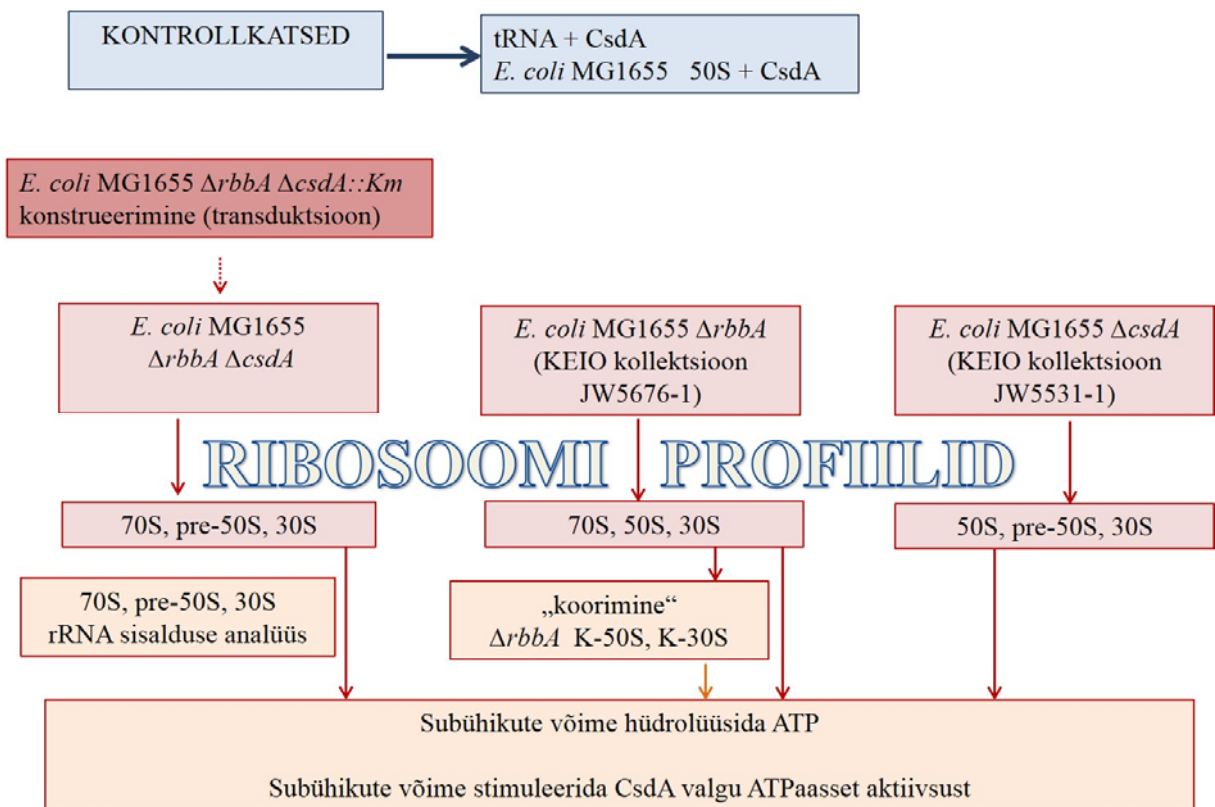
⁴ K – „kooritud“ subühikud

⁵ Δ rbbA Δ csdA – ribosoomi partiklid tüvest *E. coli* MG Δ rbbA Δ rbbA

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Eksperimentaalne strateegia

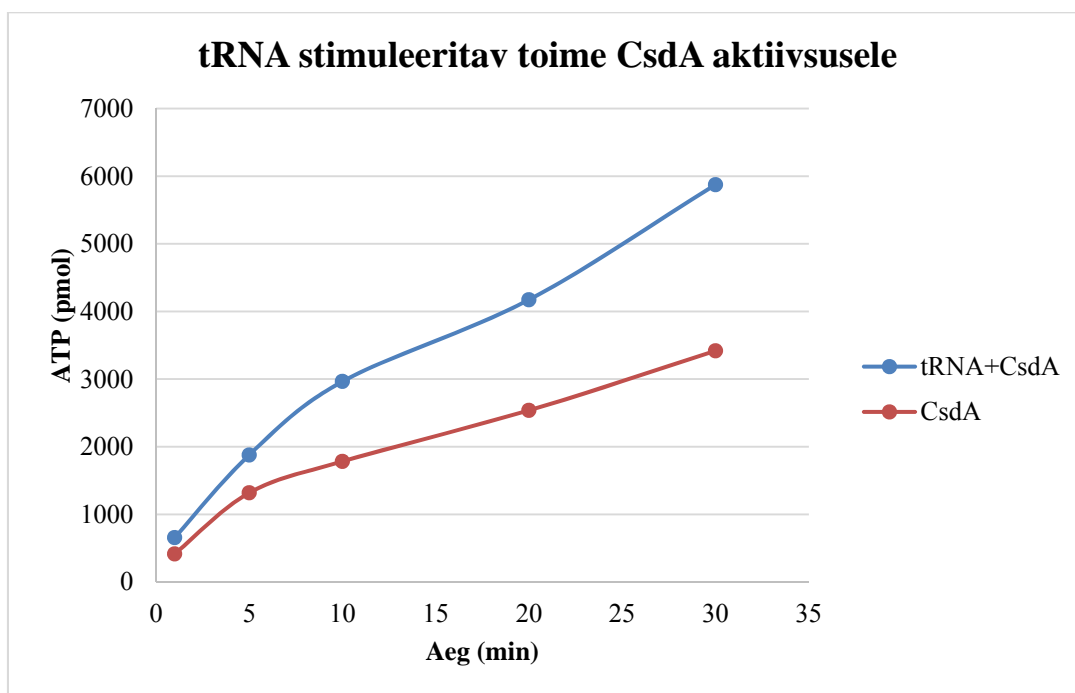
CsdA on 70 kDa molekulaarmassiga RNA helikaas, mis on kodeeritud *csdA* geeni poolt. (Jones *et al.*, 1996). CsdA harutab lahti kaksikahelalised RNA molekulid ning kasutab selleks ATP hüdroolüüsi energiat. See on madalatel temperatuuridel (alla 30°C) ekspresseeritav külmašokivalk (Iost *et al.*, 2013). Katseliselt on näidatud, et *csdA* geeni puudumisel rakkudes aeglustub ribosoomide assambleerumine, põhjustades vahepartiklite akumulereerumist. Ribosoomide biogeneesil tekkivad vaheproduktid on 50S subühiku derivaadid, kuna sisaldavad 23S rRNA-d (Charollais *et al.*, 2004; Moll *et al.*, 2002; Prud'homme-Généreux *et al.*, 2004). Samas ei ole täpselt teada, millises assambleerumise etapis on CsdA valk oluline ning mis on helikaasi substraadid. Lähtuvalt sellest võeti analüüsi alla erinevate assambleerumise vahepartiklite võime stimuleerida CsdA valgu ATPaasset aktiivsust. Töö eesmärgi saavutamiseks kontrolliti esmalt CsdA valgu aktiivsust tRNA molekuliga pilootkatse abil, mida võrreldi varem saadud tulemustega Bizebard ja kolleegide poolt. Järgnevalt vaadeldi *E. coli* MG1655 suurema subühiku stimuleeritavat toimet CsdA valgu aktiivsusele. Lähtuvalt sellest, et 50S subühikuga on seotud RbbA valk, konstrueeriti *rbbA* deletsioonitüvi eesmärgiga, et vabaneda faktorist, mis põhjustab tugevat CsdA sõltumatut cATP hüdroolüüsi (Kiel *et al.*, 1999). Konstrueeritud tüves olid deleteeritud nii RbbA kui ka CsdA valkude geenid. *E. coli* MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ tüve konstrueerimiseks kasutati P1 transduktsiooni meetodit. Järgnevalt analüüsiti MG $\Delta rbbA$, MG $\Delta csdA$ ja MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ tüvede ribosoomide profiilid *in vivo* ning vaadeldi tekkinud vahepartiklite rRNA sisaldust. Samuti kontrolliti, kas esineb ATP hüdroolüüs *E. coli* MG deletsioonitüvede ribosoomide puhul. Selleks, et uurida CsdA helikaasi substraadi, analüüsiti MG $\Delta rbbA$, MG $\Delta csdA$ ja MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ tüvede ribosoomide stimuleeritavat mõju valgu aktiivsusele. Lisaks vaadeldi MG $\Delta rbbA$ tüve "kooritud" ribosoomide võimet mõjutada CsdA helikaasi ATPaasset aktiivsust. Joonisel 12 on toodud eksperimentaalse strateegia üldskeem.



Joonis 12. Eksperimentaalse strateegia üldskeem. Töö käigus kontrolliti valgu aktiivsust tRNA ja *E. coli* MG suurema subühiku stimuleeritava toime kaudu CsdA valgu aktiivsusele. Konstrueeriti *E. coli* MG $\Delta rbbA \Delta csdA::Km$ tüve, millest eraldati ribosoomi partiklid, analüüsiti nende tüvede ribosoomi profiile *in vivo* ja rRNA sisaldust. *E. coli* MG $\Delta rbbA$ (JW5676-1) ja *E. coli* MG $\Delta csdA$ (JW5531-1) tüvedest eraldati 70S ribosoomid, 50S ja 30S subühikud, analüüsiti ribosoomi profiile ning „kooriti“ kõrge LiCl-ga 50S ja 30S subühikud, mis eraldati MG $\Delta rbbA$ tüvest. Analüüsiti kõikide subühikute ja assambleerumise vaheproduktide võimet stimuleerida CsdA helikaasi ATPaasset aktiivsust.

3.2 CsdA ATPaasse aktiivsuse analüüs

CsdA on RNA helikaas, mis on kaasatud ribosoomi biogeneesi omades ATP-sõltuvat helikaasest aktiivsust. On teada et RNA helikaasid on stimuleeritavad erinevate RNA substraatide poolt (Bizebard *et al.*, 2004). Bizebard ja kolleegide (2004) poolt on näidatud, et puhastatud CsdA on võimeline hüdrolüüsima ATP-d, kuid helikaasi ATPaasne aktiivsus on oluliselt kõrgem kui reaktsiooni lisada erinevaid RNA substraate (Bizebard *et al.*, 2004). Katseliselt on näidatud, et CsdA valgu ATPaasne aktiivsus on stimuleeritav polü(U) ja tRNA molekulide poolt (Bizebard *et al.*, 2004). Käesolevas töös kontrolliti valgu aktiivsust tRNA-ga, mis võimendab CsdA valgu ATPaasest aktiivsust ligikaudu kaks korda (joonis 13). Kontrollseeriaks on võetud ATP hüdrolüüsi kineetika, mis on tingitud ainult CsdA valgu aktiivsusest (ilma tRNA). tRNA on väike struktureeritud ribonukleinhape (73 – 94 nt), mille sekundaarstruktuuris on kolm juuksenõelastruktuuri (Moore ja Steitz, 2011). Pilootkatsete tulemuste alusel võib väita, et töös kasutatav CsdA valk on funktsionaalselt aktiivne, kuna on võimeline hüdrolüüsima ATP transport-RNA-st sõltumatult ning tRNA stimuleerib CsdA valgu ATPaasest aktiivsust (Bizebard *et al.*, 2004). Graafiku kohaselt (joonis 13) tRNA (kontsentratsioon 352 pmol/μl) substraadi juuresolekul CsdA valgu (kontsentratsioon 7 pmol/μl) kogu hüdrolüüsitud ATP hulk kolmekümneminutilise punkti on 5876 pmol ning CsdA valgu poolt põhjustatud ATP hüdrolüüs samas punktis ligi poole vähem ehk 3418 pmol.



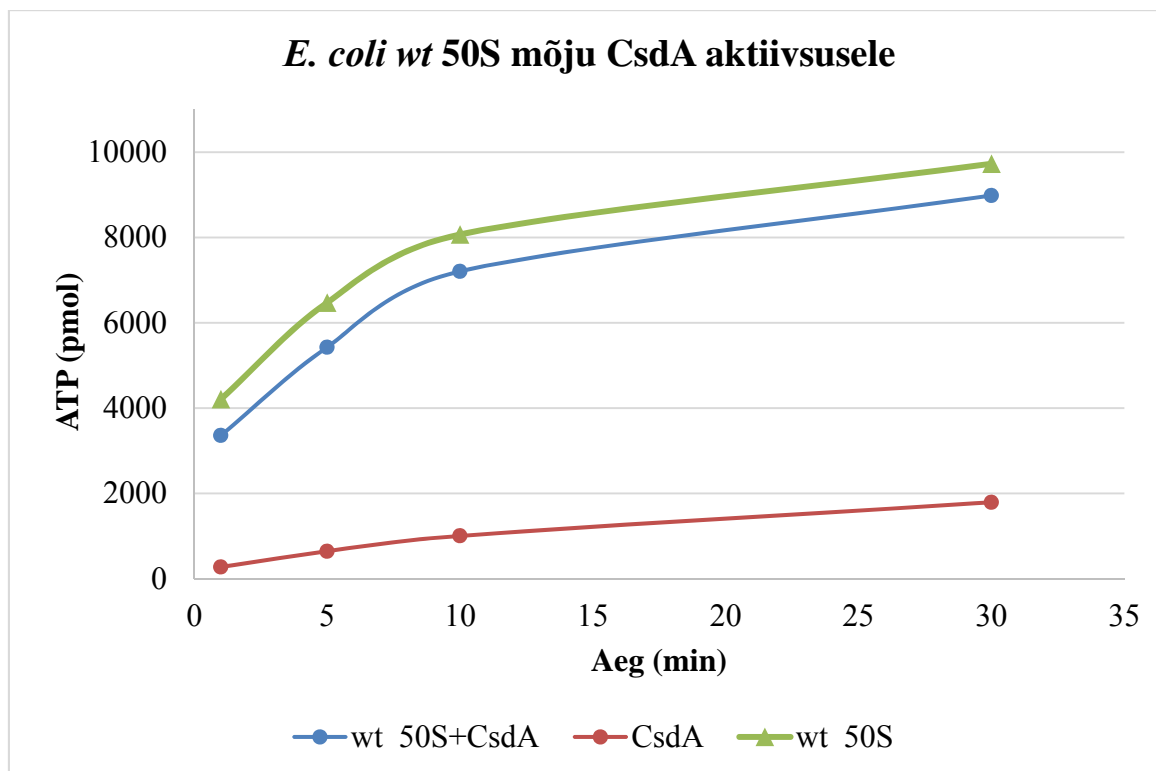
Joonis 13. Transport-RNA stimuleeritav toime CsdA valgu ATPaasse aktiivsusele erinevatel ajapunktidel. Kontrollseeria sisaldas ainult CsdA valku (ei sisaldanud tRNA). Katses kasutatud tRNA kontsentratsioon on 315 pmol/μl ja CsdA kontsentratsioon on 7 pmol/μl.

ATP hüdroolüüsimisel rakendati aktiivsöe adsorptsiooni meetodit. Reaktsiooni viidi läbi temperatuuril 25°C juures; reaktsiooniaeg 30 minutit. Proovid mõõdeti ajapunktidel: 1 min, 5 min, 10 min, 20 min ja 30 min. Katse korraldi kolm korda. ATP hüdroolüüsil vabanevat anorgaanilist radioaktiivset fosforit mõõdeti radioaktiivsuse loendajaga Perkin Elmer Tri-Carb 2800 TR.

Stimuleeritavat toimet avaldab CsdA helikaasi ATPaasse aktiivsusele ka polü(U) – uridiinidest koosnev RNA homopolümeer (150 – 200 nt; Moore ja Steitz, 2011; Bizebard *et al.*, 2004). Sarnaselt tRNA molekulile polü(U) lisamine reaktsiooni suurendab hüdroolüüsitud ATP hulka ligikaudu kaks korda võrreldes kontrolliga, kuhu substraate ei lisatud. mRNA on samuti võimeline stimuleerima CsdA helikaasi ATPaasset aktiivsust. Bakalaureusetöös substraadina kasutatud mRNA molekulid A52 ja TOE2, mis on natiivse mRNA analoogid (40 nt ja 150 nt vastavalt), stimuleerivad valguga he mlikaasset aktiivsust tRNA-le sarnasel määral. Võrreldes puhta valguga on mRNA ja tRNA substraadid juuresolekul CsdA võimeline hüdroolüüsima ATP-d ligikaudu kaks korda rohkem. Bakalaureusetöös näidati, et MG1655 ribosoomidest päritud 23S ja 16S rRNA molekulid on võimelised stimuleerima CsdA valguga ATPaasset aktiivsust ligikaudu kaks korda. Need tulemused on kooskõlas Bizebard *et al.* (2004) järeldusega, et sellised väiksed molekulid nagu tRNA, mRNA ja rRNA stimuleerivad CsdA valguga ATPaasset aktiivsust olles selle helikaasi substraadid.

On teada, et CsdA helikaas on ribosoomi assambleerumiskfaktor, kuid hetkel ei ole teada, millise subühiku biogeneesis osaleb CsdA ehk mis on selle valguga substraadideks *in vivo* (Iost *et al.*, 2013). Ühe hüpoteesi kohaselt on CsdA vajalik eelkõige suurema subühiku assambleerumisel, vaatamata sellele ei saa välistada selle valguga osalemist ka 30S subühiku biogeneesis (Iost *et al.*, 2013). Lähtuvalt sellest võeti analüüsi käesolevas töös ribosomaalse biogeneesi vahetartiklite ja ribosoomi subühikute stimulaatorset võime CsdA ATPaasele aktiivsusele.

Bakalaureusetöö tulemusted näitasid, et *E. coli* MG1655 tüve suur subühik hüdroolüüsib ATP-d võrdväärselt CsdA valguga. Antud katset korraldi ka käesoleva töö raames ning tulemused on esitatud joonisel 14. Katseandmetest lähtub, et ATP hüdroolüüs toimub sõltumata sellest, kas reaktsioonisegusse on lisatud CsdA valk või mitte. Kolmekümneminutilises punktis 50S subühiku puhul eksisteeritav ATP hüdroolüüs koos valguga on 9546 pmol ja ilma valguta on 10834 pmol, mis on ~12% kõrgem. Varasematest tulemustest järeldub, et väike subühik oli võimeline stimuleerima CsdA aktiivsust mitu korda (andmed on avaldamata). Mittespetsiifiline ATP hüdroolüüsi foon katsekäigus ei muutu.



Joonis 14. *E. coli* MG1655 50S subühiku (16 pmol/ 2µl) mõju CsdA valgu ATPaasse aktiivsusele. Katseseeriad: MG1655 50S ribosoom koos CsdA valguga; CsdA valk; MG1655 50S. Katset korrati kolm korda. ATP hüdrolüüsi analüüsimise tingimused vaata joonis 1.

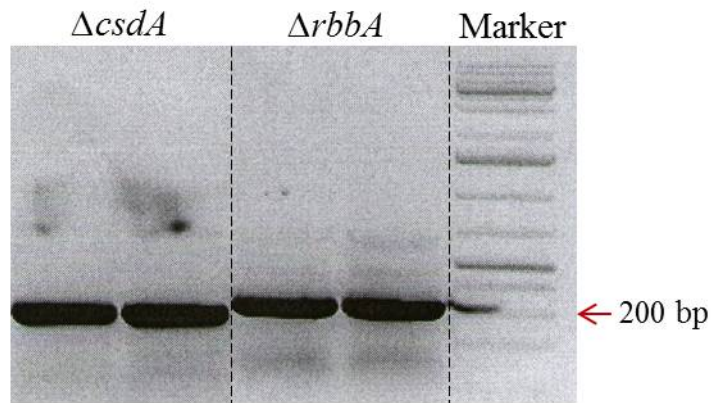
Antud tulemused viitavad sellele, et CsdA helikaasi ATPaasne aktiivus ei sõltu 50S subühiku juuresolekust või 50S subühik ei avalda stimuleeritavat toimet CsdA valgu ATPaasse aktiivsusele. Samas näitasid eelkatsed, et 50S ribosoomi peamine komponent on 23S rRNA võimeline stimuleerima CsdA valgu ATPaaset aktiivsust. Seega põhjustab CsdA sõltuvat ATP hüdrolüüsi mingi teine ribosoomiga seotud valguline faktor (Kaczanowska ja Ryden-Aulin, 2007, Kiel *et al.*, 1991; Kiel ja Ganoza, 2001). Kirjanduse andmetel selgus, et *E. coli* ribosoomidega on seotud valk RbbA (*ribosome bound ATPase*), mis omab kõrget ribosoomi-sõltuvat ATPaaset aktiivsust (Kiel *et al.*, 1999). On näidatud, et *E. coli* 70S ribosoomid on võimelised stimuleerima RbbA valgu ATP hüdrolüüsivõimet. Lisaks on näidatud, et ribosoomiga seotud RbbA valgust on võimalik vabaneda pestes ribosome NH₄Cl-ga (Kiel *et al.*, 1999). Need tulemused on kooskõlas bakalaureusetöös saadud andmetega, kus *E. coli* MG1655 tüve ribosoomide töötlemisel NH₄Cl-ga vähenes subühikute ATPaasne aktiivsus umbes kolm korda. Samas säilis piisavalt kõrge mittespetsiifiline ATP hüdrolüüs mis segas ATP hüdrolüüsi analüüsimist käesolevas töös. Seega vajasime sellist katsesüsteemi, kus ATP hüdrolüüs oleks sõltumatu RbbA valgust. Selleks, et vabaneda

mittespetsiifilisest hüdrolüüsist, vajamine edaspidisteks eksperimentideks sdellist ribosoomide populatsiooni, mis ei sisaldaks RbbA valku.

3.3. *Escherichia coli* tüve MG1655 (*Arbba* *ΔcsdA::Km*) konstrueerimine

Bakalaureusetöö tulemustest selgub, et *E. coli* MG1655 tüve ribosoomide juures on mittespetsiifiline ATPaasne aktiivsus, mis on tingitud ribosoomiga seotud valgust. Keil *et al.*, (1999) näitasid, et ATP hüdrolüüsi põhjustab RbbA valk. Käesolevas magistritöös püstitatud eesmärkide teostamiseks konstrueeriti *E. coli* tüved, kus deleteeriti *CsdA* ja *RbbA* valkude geenid. Retsipienttüvedena kasutati transformatsioonil saadud kanamütsiini resistentsuseta Keio kollektsiooni tüved JW5676-1 (*ΔrbbA*), JW5531-1 (*ΔcsdA*) ja MG1655. Tüvede konstrueerimisel kasutati standartset P1 transduktsiooni meetodikat. Bakteriofaag P1 on võimeline viiruspartiklisse võtma kuni 100 kb suuruse DNA fragmendi doonortüvest (Łobocka *et al.*, 2004). P1 viiruspartiklite loomisel kasutati doonortüvedena Keio kollektsiooni *E. coli* tüvesid, millest olid deleteeritud *rbbA* või *csdA* geenid. Keio kollektsiooni doonortüvede (JW5676-1, JW5531-1) *rbbA* või *csdA* geen on asendatud kanamütsiini resistentsuskassetiga, mille otstes on pärmi Flp-rekombinaasi sihtmärk järjestused (FRT) (Baba *et al.*, 2006). Flp-rekombinaas viib läbi koht-spetsiifilise rekombinatsiooni Keio kollektsiooni tüvede (JW5531-1 ja JW5676-1) kanamütsiini resistentsuskasseti ümbritsevate FRT (*Flp recombination target*) järjestuse vahel. Seega transformatsiooni käigus tüvede *E. coli* MG1655 *ΔcsdA::Km* ja *Arbba::Km* genoomidest eemaldatakse kanamütsiini resistentsust kodeeriv geen. Doonortüvest eraldatud bakteriofaag P1 viiruslusaati kasutati transduktsiooni retsipienttüvede nakatamiseks.

E. coli *Arbba* *ΔcsdA* konstrueerimiseks, oli vaja vabaneda kanamütsiini resistentsuskassetist. Selleks teostati *E. coli* tüvede *ΔcsdA::Km* ja *Arbba::Km* (JW5531-1 ja JW5676-1 vastavalt) transformatsiooni *pCP20* plasmiidiga, mis sisaldab ampitsilliini ja kloramfenikooli resistentsuse geeni, Flp-rekombinaasi geeni ning temperatuuritundlikku replikoni (Cherepanov ja Wackernagel, 1995). Tüvede õigsust kontrolliti koloonia-PCR meetodiga (joonis 15). PCR produktide visualiseerimiseks valmistati 1,2% agarosgeeli TBE puhvris. Elektroforees viidi läbi jooksul 150V. Geelelektroforeesi pildil (joonisel 15) on näha, proovide pikkused on umbes 200 aluspaari pikkusega. Seega katse käigus on õnnestunud vabaneda kanamütsiiniresistentsuskassetist.



Joonis 15. Tüvede *ΔcsdA* ja *ΔrbbA* valideerimine. Noolega on näidatud *ΔcsdA* ja *ΔrbbA* PCR produktide pikkus (200 bp), mis on esitatud kahes korduses. Gelelektroforeesi markerina kasutati *Gene Ruler 1kb DNA Ladder Plus*. PCR produktide visualiseerimiseks valmistati 1,2% agarosgeelile TBE puhvril.

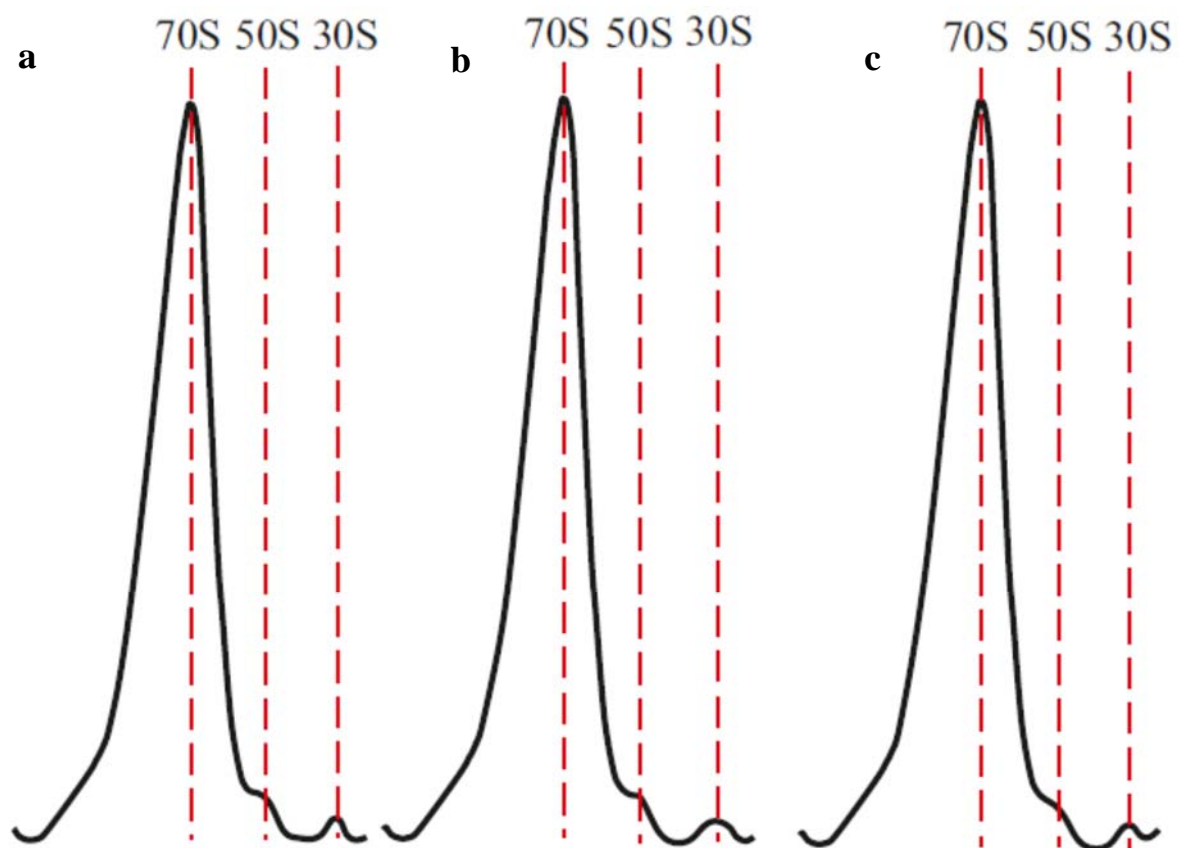
Escherichia coli MG1655 *ΔrbbAΔcsdA::Km* tüve konstrueerimiseks kasutati transdutseerimisel doonortüvedena JW5676-1 (*ΔrbbA*) ja JW5531-1 (*ΔcsdA*) ning retsipienttüvedena MG1655 ja transformatsioonil saadud *E. coli ΔrbbA* ja *ΔcsdA* tüved. Transduktsiooni tulemusena valmistati MG *ΔrbbAΔcsdA* tüvi, milles puudusid nii *csdA* kui *rbbA* geenid ning mis sisaldas kanamütsiini resistentsuskasseti. Mõlema valgu deleteerimine ei mõjutanud rakkude kasvu 37°C juures rikkal söötmel.

3.3.1 *E. coli* tüvede iseloomustamine

Esmalt analüüsiti, kas mei poolt konstrueeritud deletsioonitüvedel tekivad ribosoomide biogeneesi häired (assambleerumise vahepartiklid) ja kas *rbbA* geeni puudumine mõjutab ribosoomi aeglustumist/vahepartiklite teket. On teada, et CsdA helikaas on kaasatud ribosoomi biogeneesi protsessidesse ning selle valgu geeni puudumine põhjustab ribosoomi assambleerumise aeglustumist ning vahepartiklite akumulatsioonist madalatel temperatuuridel (Peil *et al.*, 2008). Samas ei olnud teada, kas ja kuidas mõjutab ribosoomide biogeneesi RbbA valgu puudumine. Antud töös võrreldakse MG *ΔrbbAΔcsdA*, MG *ΔrbbA*, MG *ΔcsdA* ja MG1655 tüvede ribosoomide profiile rakukultuuridest mis on kasvatatud erinevatel temperatuuridel.

E. coli MG *ΔrbbAΔcsdA*; MG *ΔrbbA* ja *E. coli* MG tüved kasvatati 37°C juures optilise tiheduseni 1,5 – 1,6 (A_{600}). Ribosoomide, subühikute ja vahepartiklite analüüsamiseks fraktsioneeriti ribosoomid 15% - 30% sahharoosigradiendil ning visualiseeriti vastavalt kirjeldatud meetodile. Joonisel 16 on näha, et 37°C juures kasvatatud tüvede MG *ΔrbbA*

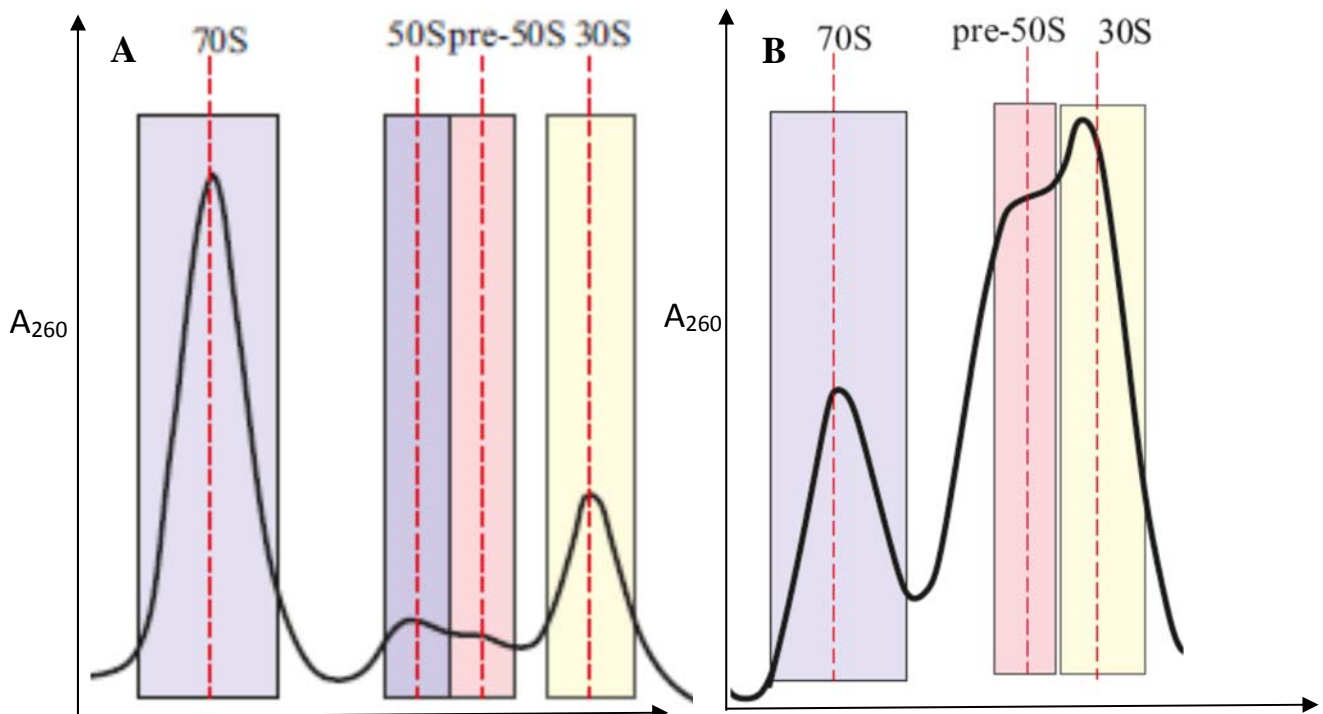
ΔcsdA ning MG *ΔrbbA* ja MG *ΔcsdA* tüvede ribosoomi profiilid on sarnased. Ribosoomide ja subühikute tasakaal erinevate tüvede vahel on samasugune. Valdav osa ribosoomipartiklitest on detekteeritav 70S ribosoomidena ning vabade subühikute tase on väga madal. Deletsioonitüvedel MG *ΔrbbA* ja *E. coli* MG *ΔcsdA* 37°C juures ei näe muutust ribosoomi profiilides, mis viitab sellele, et CsdA ja RbbA valkude puudumine soodsates kasvutingimustes ei häiri ribosoomide biogeneesi (joonis 16).



Joonis 16. 37°C juures kasvatatud *E. coli* tüvede ribosoomide profiilid. (a) *E. coli* MG1655; (b) *E. coli* MG *ΔrbbA*; (c) *E. coli* MG *ΔrbbAΔcsdA*. Kõik tüved kasvatati optilise tiheduseni kuni 1,5 – 1,6 (A_{600}). Ribosoomi partiklid analüüsiti ja fraktsioneeriti 15% - 30% sahharoosi gradiendil ning tsentrifuugiti SW28 rootoris $\omega^2t=2,8 \times 10^{11}$ rad²·s, 4°C. Gradiendi kontsentratsioon muutub lineaarselt. Ribosoomide partiklid visualiseeriti läbivooluspekrofotomeetri (A_{260nm}) UV900, peristaatilise pumba P1 ja isekirjutaja Recorder 112 abil.

CsdA helikaas on külmašokivalk, mille ekspressioonitase suureneb madalatel temperatuuridel (Turner *et al.*, 2007). CsdA geeni puudumine viib suurema subühiku eellaspartiklite akumulatsioonini (Jones *et al.*, 1996). Bakalaureusetöö tulemused näitasid, et 15°C juures kasvatatud MG *ΔcsdA* tüvi ribosoomide biogenees on häirunud. Ebasoodsates tingimustes

CsdA valgu puudumisel (MG $\Delta csdA$ tüvi) aeglustub ribosoomi assambleerumine ning akumulerevad vahepartiklid (joonis 17a), mis on suurema subühiku derivaadid (Peil *et al.*, 2008). Ebasoodsates tingimustes kasvatatud MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ tüve ribosoomi profiilid erinevad *E. coli* MG1655 tüve profiilidest (joonis 17b ja 16a). RbbA ja CsdA geenide üheaegsel deleteerimisel on rakus detekteeritavad vahepartiklid, mis on tõenäoliselt tingitud ribosomaalse assambleerumise aeglustumisest sarnaselt $\Delta rbbA$ tülvele. MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ tüve rakkudes on vähenenud assambleerunud 70S ribosoomi osakaal ning on tõusnud vabade subühikute tase. Lisaks akumulereunud 50S vahepartiklid (joonis 17b). Ebasoodsates tingimustes CsdA ja RbbA valkude geenide deleteerimisel on häirinud ribosoomide assambleerumine ning on akumulereunud vahepartiklid.



Joonis 17. *E. coli* tüvede ribosomaalsed profiilid. (a) 15°C juures kasvatatud MG $\Delta csdA$ tüvi kuni optilise tiheduseni 1,2 (A_{600}). (b) 18°C juures kasvatatud MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ tüvi optilise tiheduseni 0,8 (A_{600}). Ribosoomi partiklid eraldati 15% - 30% sahharoosi gradiendil ning tsentrifuugiti SW28 rootoris $\omega^2 t = 2,8 \times 10^{11} \text{ rad}^2 \cdot \text{s}$, 4°C. Gradiendi kontsentratsioon muutub lineaarselt. Ribosoomide partiklid visualiseeriti läbivoolu-spekrofotomeetri ($A_{260\text{nm}}$) UV900, peristaatilise pumba P1 ja isekirjutaja Recorder 112 abil.

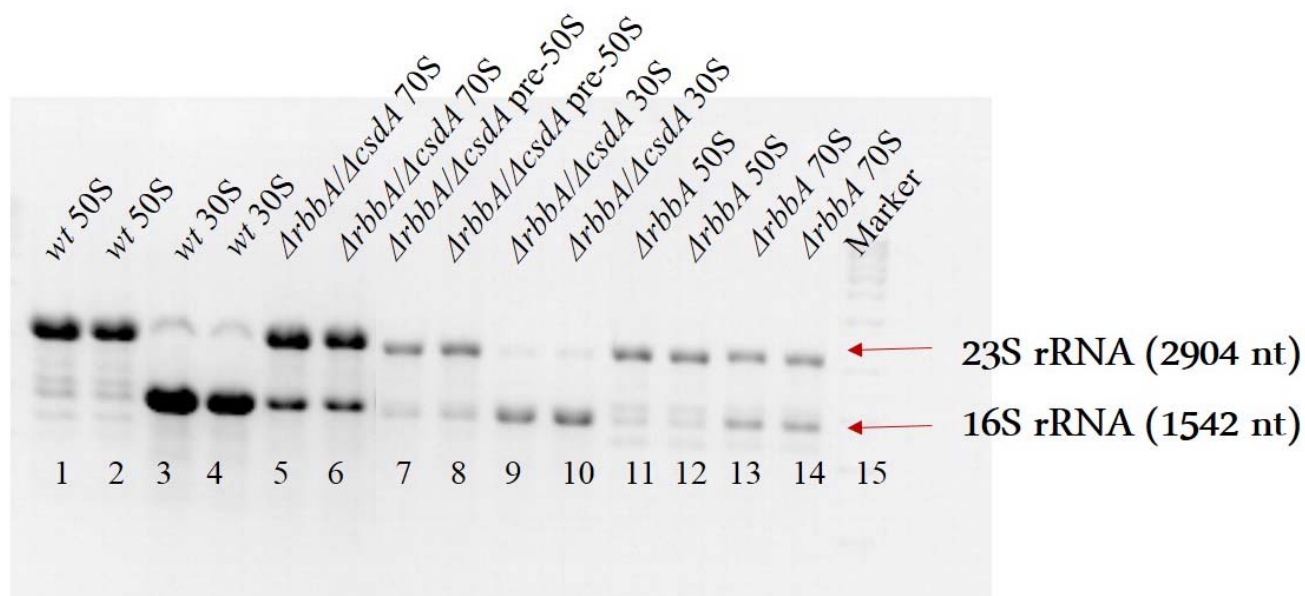
Antud töö ülesanneks oli identifitseerida CsdA valku stimuleerivad substraadid kasutades selleks ribosoomi assambleerumisel akumulereuvaid partikleid. Bakalaureusetöös kasvatati MG $\Delta csdA$ 18°C ja 15°C juures. Kooskõlas kirjanduse andmetega akumulereusid MG $\Delta csdA$

tüve puhul ribosoomide biogeneesi vahepartiklid eelkõige madalal temperatuuril (15°C) ja varajases eksponentsiaalses kasvufaasis. Lähtuvalt sellest kasvatati MG *ΔcsdA* tüve edaspidi 15°C juures, kus biogeneesi vaheproduktide akumulatsioon oli kõige suurem. MG *ΔcsdA*, MG *ΔrbbA*, MG *ΔrbbAΔcsdA* tüved kasvatati vedelkultuuris optilise tiheduseni 08 – 1,2 (A_{600}). Kuna ribosoomi assambleerumise fenotüübi on näha eksponentsiaalses kasvufaasis, kus toimub aktiivne ribosoomide biogenees. MG *ΔrbbA* tüvest eraldati funktsionaalsed 70S ribosoomid ja dissotseeriti neid 50S ja 30S subühikuteks sahharoosgradiendil 10% - 25%. MG *ΔrbbAΔcsdA* tüvest, mis oli kasvatatud 18°C juures, eraldati funktsionaalsed 70S ning 50S eellaspartiklid (pre-50S) ja 30S subühikud. Bakalaureusetöö käigus eraldati 15°C juures kasvatatud MG *ΔcsdA* tüvest pre-50S partikleid ja 50S subühikud. Eraldatud pre-subühikutes määrati rRNA sisalduse ning neid kasutati CsdA valgu ATPaasse aktiivsuse hindamiseks.

3.3.2 *E. coli* MG *ΔrbbAΔcsdA* ja MG *ΔrbbA* tüve rRNA sisalduse analüüs

Järgnevalt analüüsiti MG *ΔrbbAΔcsdA* ja MG *ΔrbbA* tüvedest eraldatud ribosoomide, subühikute ja vahepartiklite rRNA sisaldust geelektroforeesi abil. Selle eesmärgiks oli identifitseerida, milline RNA on vahepartiklite koostises. Samuti vaadeldi RNA iseloomu. Kontrollina kasutati MG1655 tüve 50S ja 30S subühikud. Joonisel 18 on näha, et valdav osa analüüsitud rRNA-st on intaktne ja ei esine fragmenteeritud või lagunenuid RNA fragmente. 70S ribosoomide koostises on nii 16S, kui ka 23S rRNA. MG *ΔrbbA* (37°C) tüve 70S-st dissotseerunud 50S subühik sisaldub 23S rRNA ja funktsionaalses 70S ribosoomid on nii 23S kui ka 16S rRNA molekulid. MG *ΔrbbAΔcsdA* tüve (18°C) 70S ribosoomide koostises on 23S ja 16S rRNA, pre-50S fraktsioonis on 23S rRNA. MG *ΔrbbAΔcsdA* tüve (18°C) 30S subühikute fraktsioonis sisaldub ainult 16S rRNA. See tähendab, et kuna selles fraktsioonis ei ole nähtavaid 23S rRNA, ei toimu 23S rRNA lagunemist (joonis 18). Antud tulemuste põhjal võib väita, et 30S ja 50S subühikutes olev rRNA on valdavalt intaktne. Seega võime me eeldada, et valdav osa ribosoomi biogeneesi vaheproduktidest jõuab aktiivsete ribosoomide fraktsiooni (70S). Antud eeldust toetavad Peil *et al.* (2008) tulemused, kus näidati, et ribosomaalses biogeneesis assambleeruvad vahepartiklid on suurema subühiku eellased. Peil *et al.* (2008) analüüsisid ka rRNA protsessimise taset 50S subühiku eellaspartiklites ekstensiooni meetodi abil. Selgus et, et *E. coli* *ΔcsdA* tüvest pärit assambleerumise vahepartiklid sisaldasid 23S rRNA, mille 5' otstes on kolm või seitse lisanukleotiidi, samal ajal kui küpses 70S ribosoomis on täielikult protsessitud 23S rRNA. Pulssmärgimisemethodikaga näidati, et akumulatsioon 50S subühiku eellane lülitub lõpuks funktsionaalse ribosoomi koosseisu (Peil *et al.*, 2008). Seega, võttes arvesse kõiki

eelpoolmainitud tulemusi, võime me katsetes kasutatud vahepartikleid käsitleda lihtsustatult kui biogeneesi vaheprodukte, mis võivõimaldaksid meil identifitseerida võimalikke CsdA valgu looduskke substraate ATPasse.



Joonis 18. *MG ΔrbbAΔcsdA*, *MG ΔrbbA* ja MG1655 tüve ribosoomide rRNA sisaldus. MG1655 tüve 50S (rajad 1 ja 2), MG1655 tüve 30S (rajad 3 ja 4); *MG ΔrbbA ΔcsdA* tüve 70S ribosoomid (rajad 5 ja 6), pre-50S (rajad 7 ja 8); 30S (rajad 9 ja 10). *MG ΔrbbA* 50S subühik (rajad 11 ja 12), 70S ribosoom (rajad 13 ja 14). Nooltega on näidatud 23S rRNA ja 16S rRNA asukohad ja nende pikkused. Rajas 15 on suurusmarker (*Gene Ruler DNA Ladder Plus*). Visualiseerimiseks kasutati 1,2% agarosgeeli TBE puhvril.

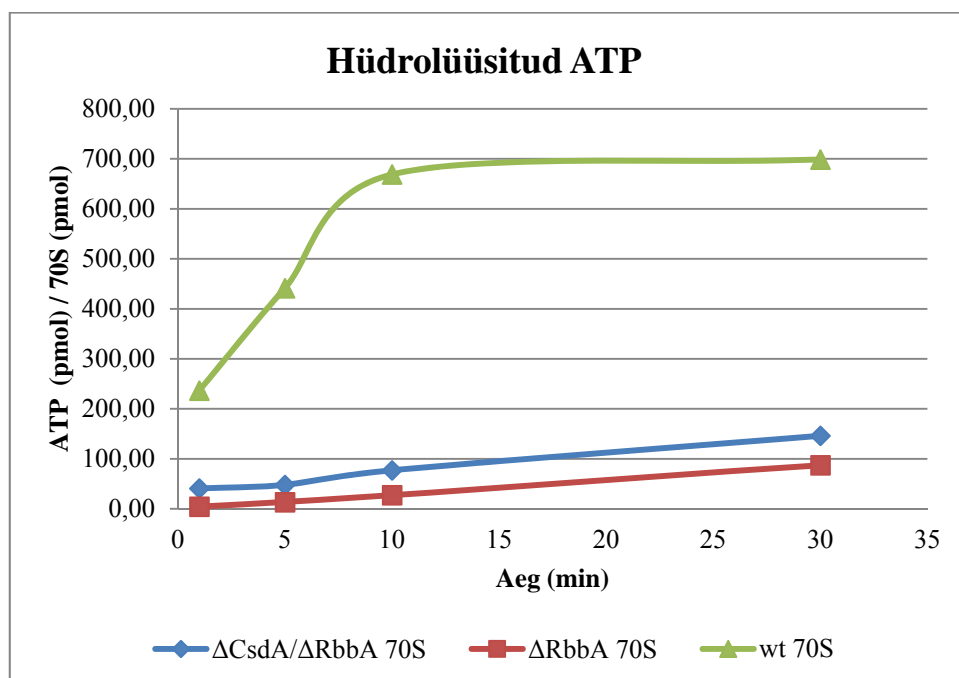
4. *E. coli* tüvede ribosoomi partiklite võime hüdrolüüsida ATP-d

Käesoleva töö käigus konstrueeriti *E. coli* MG *ΔrbbAΔcsdA* tüved, millel puuduvad RbbA ja CsdA valkude geenid. Selgus, et *rbbA* ja *csdA* geenide deleteerimisel akumulereuvad vahepartiklid, mis võivad olla küpse 50S subühiku eellased. Järgmiseks etapiks oli kontrollida, kas MG *ΔrbbAΔcsdA* ja MG *ΔrbbA* tüvede ribosoomid võivad põhjustada mittespetsiifilist ATP hüdrolüüsi ehk kas on õnnestunud vabaneda mittespetsiifilisest ATP hüdrolüüsist, mida põhjustas RbbA valk.

ATP hüdrolüüsi analüüsimiseks rakendati aktiivsöe adsorptsiooni meetodit (Kuusk *et al.*, 2002). Reaktsiooni esimeses etapis eelinkubeeriti valku uuritava substraadiga. Reaktsioon alustati ATP lisamisega ning peatati erinevatel ajapunktidel (1 min, 5 min, 10 min ja 30 min) STOP lahuse (aktiivsöe adsorptsioonilahus) lisamisega, mis seob reaktsioonisegus sisalduvad

komponendid välja arvatud vabanenud anorgaanilise fosfori. Hüdrolüüsitud ATP hulk mõõdeti radioaktiivsuse loendajaga ning eriaktiivsuse põhjal arvutati hüdrolüüsitud ATP molekulide hulk pikomoolides. ATP hüdrolüüsi analüüsi tulemused on esitatud kahel kujul: kogu hüdrolüüsitud ATP hulk pikomoolides või suhtena, kus ATP pikomoolide arv on jagatud ribosoomi pikomooli arvuga. Katsetes analüüsiti MG *ΔrbbAΔcsdA*, MG *ΔrbbA* ja MG *ΔcsdA* tüvede RNA-valk substraatide CsdA valgu ATPaasset aktiivsust stimuleerivat toimet.

Selleks, et määrata ribosoomi partiklite ATPaasset aktiivsuse olemasolu viidi läbi seeria katseid, kus kasutati erinevaid valgu helikaasset aktiivsust stimuleerivaid substraate ja mõõdeti nende stimuleerivat mõju ATPaassele aktiivsusele. Alguses vaadeldi kas ja millisel määral MG *ΔrbbAΔcsdA* (kasvatatud 18°C juures) ja MG *ΔrbbA* (kasvatatud 37°C juures) tüvede 70S ribosoomid hüdrolüüsivad ATP-d. Kontrolliks kasutati *E. coli* MG1655 tüve 70S ribosoomie. Joonisel 19 on illustreeritud 70S ribosoomide võime stimuleerida CsdA valgu ATPaasset aktiivsust. Tulemustest järeldub, et MG1655 tüve 70S ribosoom hüdrolüüsib ATP palju efektiivsemalt, kui *E. coli* *ΔrbbA* ja *E. coli* *ΔrbbAΔcsdA* tüvede 70S ribosoomid. RbbA valgu puudumisel kaob liigne ATPaasne aktiivsus (joonis 19). Antud tulemused on kooskõlas Ganoza ja Kiel (2001) teadustöö järeldusega, mis seisnevad selles, et ribosoomiga koos puhastub välja RbbA valk, mis hüdrolüüsib ATP-d.



Joonis 19. *E. coli* MG1655; MG *ΔrbbAΔcsdA* ja MG *ΔrbbA* 70S ribosoomide ATPaasne aktiivsus erinevatel ajapunktidel (1 min, 5 min, 10 min ja 30 min). *E. coli* MG1655 tüve 70S

(14 pmol/ 2 µl), *E. coli* MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ 70S (14,4 pmol/ 2 µl) ja $\Delta rbbA$ 70S (15 pmol/2 µl) ribosoomide hüdrolüüsitud ATP hulk ühe pikomooli kohta.

Tulemused näitavad, et MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ ja MG $\Delta rbbA$ ribosoomide võime hüdrolüüsida ATP on kaotanud (joonis 19). Kolmekümneminutilises punktis MG1655 tüve ribosoomide poolt hüdrolüüsitud ATP hulk ribosoomi ühe pikomooli kohta on 699 ning MG $\Delta rbbA$ 70S ribosoomide poolt 87 ühikut ribosoomi ühe pikomooli kohta; MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ tüve 70S ribosoomide poolt hüdrolüüsitud ATP hulk ribosoomi ühe pikomooli kohta on 146 ühikut. MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ ja MG $\Delta rbbA$ 50S ning 30S subühikud antud tüvedest käitusid samamoodi nagu 70S ribosoomid samadest tüvedest ehk ATP hüdrolüüsi ei toimunud. MG $\Delta rbbA \Delta csdA$ ja MG $\Delta rbbA$ tüvede 70S ribosoomide ning 50S ja 30S subühikute signaal on jäänud fooni tasemele. Antud tulemustest järeldub, et tüve konstrueerimisel on õnnestunud vabaneda mittespetsiifilisest ATP hüdrolüüsist, mis on tingitud RbbA valgust.

5. Ribosoomi partiklite stimuleeriv toime CsdA valgu ATPaasse aktiivsusele

CsdA helikaas on DEAD-*box* perekonda kuuluv helikaas, millele on iseloomulikud RNA ja ATP-seondumis motiivid (Cordin *et al.*, 2006). CsdA harutab lahti kaksikahelalise RNA struktuure kasutades selleks ATP energiat (Iost ja Dreyfus, 2006). Lisaks omab CsdA mittespetsiifilist ATPaasset aktiivsust ka ilma spetsiifilise substraadiga seondumist (Rocak ja Linder, 2004). On näidatud, et erinevad RNA substraadid on võimelised valgu ATPaasset aktiivsust stimuleerima (Bizebard *et al.*, 2004). Antud töö peaesmärgi saavutamiseks analüüsiti CsdA valgu ATPaasset aktiivsust, mis iseloomustab kaudselt tema võimet käituda helikaasina. Seega võime me hinnata CsdA helikaasset aktiivsust mõõtes valgu võimet hüdrolüüsida ATP'd. Antud töö ülesanneks oli analüüsida CsdA valgu funktsionaalsust erinevate substraatide toimel ning hinnata erinevate ribosoomi partiklite võimet stimuleerima valgu aktiivsust. CsdA aktiivsuse määramisel kasutatud ribosoomid on toodud välja tabelis 3.

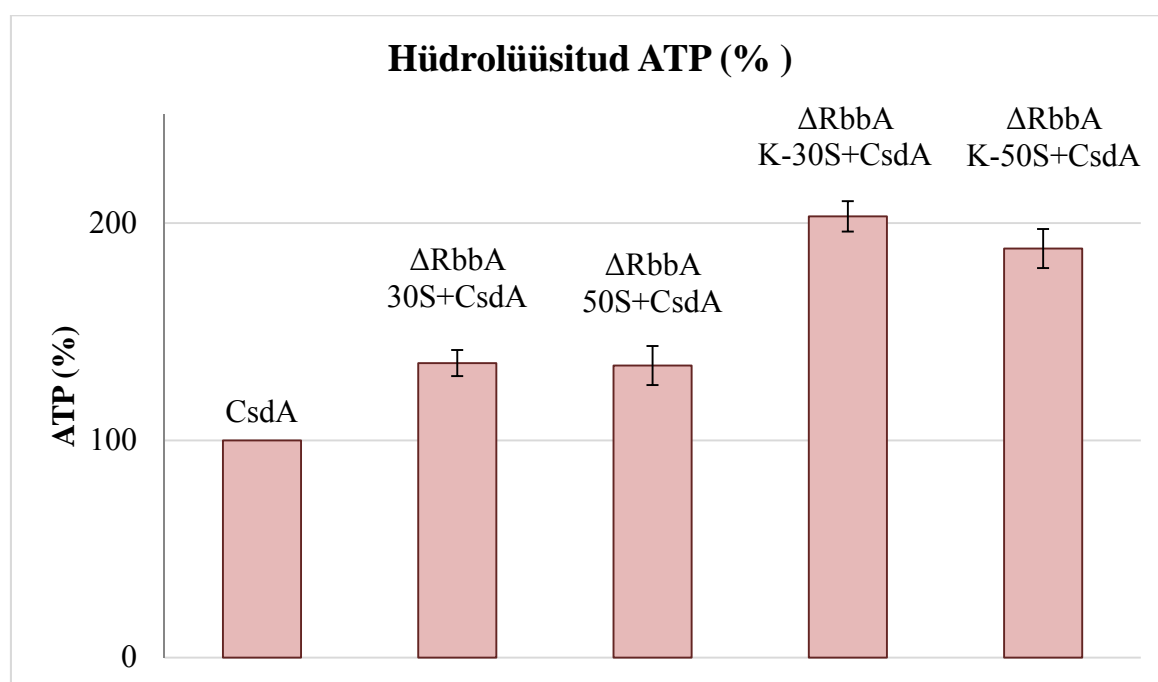
Tabel 3. Kasutatud ribosoomid

<i>E. coli</i> tüvi	Ribosoomi partikkel		Ribosoomi profiil¹
MG $\Delta rbbA$	50S	70S-st dissotseeritud	Joonis 16b
MG $\Delta rbbA$	30S	70S-st dissotseeritud	Joonis 16b
MG $\Delta rbbA$	„Kooritud“ 50S (K-50S)	70S-st dissotseeritud	Joonis 16b
MG $\Delta rbbA$	„Kooritud“ 30S (K-30S)	70S-st dissotseeritud	Joonis 16b
MG $\Delta rbbA \Delta csdA$	Pre-50S	Vabad pre-50S	Joonis 17b
MG $\Delta rbbA \Delta csdA$	30S	Vabad 30S	Joonis 17b
MG $\Delta csdA$	Pre-50S	Vabad pre-50S	Joonis 17a
MG $\Delta csdA$	50S	Vabad 30S	Joonis 17a

¹Viide ribosoomi profiili joonisele, kus on näidatud, mis fraktsioonides subühikud ja vahepartiklid olid eraldatud.

CsdA valgu ATPaasse aktiivsuse hindamisel võrreldi kolmekümneminutilise punkti aktiivsusi. CsdA valgu aktiivsust võeti 100%-ks ja võrreldi selle suhtes, kui palju tõuseb hüdrolüüsitud ATP hulk ribosoomi partiklite stimuleerival toimel. Antud kontekstis MG $\Delta rbbA$ tüvi kasutatakse kontrollina, kuna ei ole näha, et *rbbA* geeni deleteerimine põhjustab mingit muutusi ribosoomi profiilis, seega ka ribosoomi biogeneesis (joonis 5b). Alguses vaadeldi, kas ja kuidas MG $\Delta rbbA$ tüve funktsionaalsetest 70S ribosoomidest eraldatud 50S ja 30S subühikud stimuleerivad CsdA valgu ATPaasset aktiivsust. Nedne subühikute puhul ei esine mittespetsiifilist ATP hüdrolüüsi (vt. ptk. 4). Suur ja väike subühikud avaldavad sarnast, kuid väikest mõju CsdA valgu ATPaasse aktiivsusele (joonis 20). Kolmekümneminutises punktis CsdA helikaasi võime hüdrolüüsida ATP-d MG $\Delta rbbA$ 50S juureolekul oli vaid 35% ja 30S subühikuga 34% kõrgem, võrreldes ainult CsdA valgu poolt hüdrolüüsitud ATP hulgaga. Oluliselt tugevama võimega stimuleerivad CsdA valgu aktiivsust LiCl-ga „kooritud“ *E. coli* $\Delta rbbA$ tüvest subühikud, mis olid dissotseerunud 70S-st (joonis 20). „Kooritud“ ribosoomidel on osa valke kange soolaga eemaldatud (umbes 50% ribosomaalsetest valkudest). LiCl soolaga „pesemine“ põhjustab nõrgalt seotud ribosoomi valkude dissotseerumist ribosoomidest (Moore *et al.*, 1975). Suurema ja väiksema subühiku puhul kasutati 2M ja 1M kontsentratsiooniga LiCl soolat (vastavalt). Peale „koorimist“ 50S subühikuga jäävad seotuks valgud L1, L2, L5, L6, L9, L10, L11, L15, L16, L18 ja L23. Väiksemas subühiku struktuuris jäävad peale „koorimist“ ribosomaalsed valgud: S2, S3, S5, S9, S10, S13, S14 ja S20 (Pulk *et al.*, 2010).

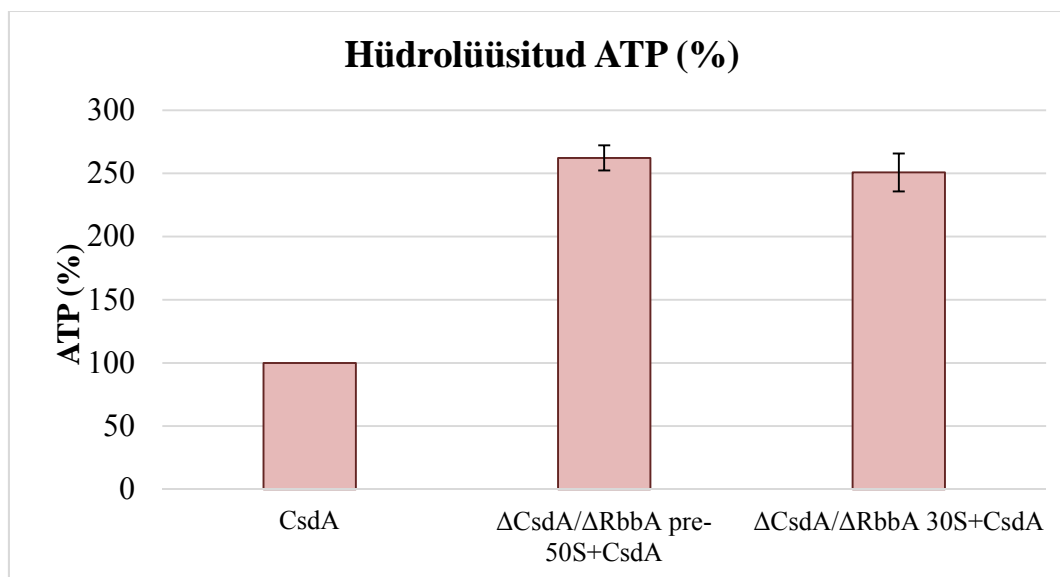
Soolaga “kooritud” 70S päritoluga MG *ΔrbbA* 50S ja 30S subühikud võimelised stimuleerima CsdA valgu aktiivsust peaaegu poolteist korda (joonis 20). Kolmekümneminutilises punktis „kooritud“ *ΔrbbA* 50S võimendas CsdA helikaasi aktiivsust 88% võrra ning „kooritud“ *ΔrbbA* 30S subühik stimuleeris ATP hüdrolüüsi 103% võrra. LiCl-ga „pestud“ ribosoomi subühikuid võib käsitleda biogeneesi vaheproduktina, sest r-valkude lisamisega on võimalik taastada ribosoomide funktsionaalsust. Võttes arvesse, et CsdA on 50S assambleerumise valk, võib oletada, et “kooritud” 50S saab peegeldada 50S subühiku assambleerumise vahepartiklit. Seega võiksid soolaga töödeldud subühikud imiteerida assambleerumise vaheolekuid ning olla CsdA helikaasi märklauaks. Antud tulemuste põhjal saab järeldada, et CsdA helikaasi ATPaasset aktiivsust stimuleerivad kõige efektiivsemalt *ΔrbbA* 50S ja 30S subühiku eellaspargid (“kooritud”, K-50S, K-30S). Võimalik, et CsdA helikaas kasutab oma substraadina ribosoomi assambleerumise vaheprodukte, millel puuduvad LiCl-ga maha pestvad r-valgud.



Joonis 20. MG1655*ΔrbbA* tüve ribosoomide ATPaasne aktiivsus kolmekümneminutilises punktis. MG *ΔrbbA* tüve 70S-st dissotseerunud 50S subühikud (6 pmol/ 1 μl), 30S subühikud (6,5 pmol/ 1 μl); 70S ribosoomidest dissotseerunud „kooritud“ 50S (K-50S, 5 pmol/ 1 μl) ja „kooritud“ 30S (K-30S, 6 pmol/ 1 μl). Iga katse korrati kolma korda. Reaktsiooni tingimused vt. joonis 13. Hüdrolüüsitud ATP hulk on väljendatud protsentides, kus CsdA valgu poolt hüdrolüüsitud ATP on võetud 100%-ks.

5.1 *E. coli* MG $\Delta rbbA\Delta csdA$ tüve ribosoomide stimuleeritav toime

CsdA helikaasi stimulatorset mõju analüüsi ka konstrueeritud bakteritüvest *E. coli* MG $\Delta rbbA\Delta csdA$ päritud ribosoomidel. CsdA on külmašokivalk, mis ekspresseeritakse madalatel temperatuuridel (Turner *et al.*, 2007). Ebasoodsates tingimustes bakterirakkude ribosomaalne biogenees on aeglustunud ning on tekkinud vahepartiklid, mis on suurema subühiku eellaspartiklid (Peil *et al.*, 2008). Antud töös sahharoosgradiendil 15% - 30% eraldati MG $\Delta rbbA\Delta csdA$ tüve vabad ribosoomi partiklid pre-50S ja 30S ning analüüsi nende võime stimuleerida CsdA ATPaasset aktiivsust. Tulemustest järeldub, et MG $\Delta rbbA\Delta csdA$ pre-50S ja 30S tugevalt stimuleerivad CsdA valgu ATPaasset aktiivsust. Joonisel 21 graafiliselt illustreeritud, et nii pre-50S kui ka 30S stimuleerivad CsdA valgu ATPaasset aktiivsust peaaegu poolteistkorda. Suurema subühiku eellaspartikli juuresolekul helikaasi aktiivsus tõuseb 162% võrra ja 30S subühiku juuresolekul 150% võrra.



Joonis 21. *E. coli* MG $\Delta rbbA\Delta csdA$ tüve ribosoomide ATPaasne aktiivsus. MG $\Delta rbbA\Delta csdA$ tüve vabade pre-50S vahepartiklite (6 pmol/ 1 μ l), 30S subühikute (3 pmol/ 1 μ l) stimuleeritav mõju CsdA valgu aktiivsusele kolmekümneminutlises punktis. Iga katse korrati kolma korda. Reaktsiooni tingimused vt. joonis 13. Hüdrolüüsitud ATP hulk on väljendatud protsentides, kus CsdA valgu poolt hüdrolüüsitud ATP on võetud 100%-ks.

Tulemustest järeldub, et MG $\Delta rbbA\Delta csdA$ tüve 50S subühiku eellaspartiklid ja 30S subühik on võimelised tugevalt stimuleerima CsdA valgu ATPaaset aktiivsust. Võrreldes bakalaureusetöö andmetega, kus MG $\Delta csdA$ tüve vabad pre-50S ja 50S subühikud olid võimelised stimuleerima CsdA aktiivsust ligikaudu kaks korda, järeldub, et MG $\Delta csdA$ ja MG $\Delta rbbA$ tüvede vabad pre-50S ja 50S subühikud stimuleerivad valgu aktiivsust

võrdväärselt. CsdA substraadina käitusid *in vitro* katsetes ribosoomi assambleerumise vahepartiklid ning vähesel määral ka 50S ja 30S subühikud. Käesoleva magistritöö tulemused on kooskõlas hüpoteesiga, et CsdA helikaas osaleb ribosoomide biogeneesis.

***Escherichia coli* ribosoomi biogeneesi osaleva RNA helikaasi CsdA
substraadispetsiifika analüüs**

KOKKUVÕTE

Käesolevas magistritöös püüti tuua selgust CsdA helikaasi rolli ribosoomide assambleerumises. Eesmärgiks oli välja selgitada, milliseid substraate kasutab CsdA valk ribosoomi biogeneesi *in vivo*. Probleemi lahendamiseks analüüsiti *E. coli* tüvede ribosoomipartiklite võimet stimuleerida CsdA helikaasi ATPaasset aktiivsust. Autori bakalaureusetöö tulemustest selgus, et ribosoomiga on seotud valk, mis põhjustab tugevat mittespetsiifilist ATP hüdrolüüsi. Toetudes Kiel *et al.* (1991) andmetele, et ATP hüdrolüüsi põhjustab RbbA valk, konstrueeriti *E. coli* tüvi, millel puudus *rbbA* geen, millest oli tingitud liigne ATPaasne hüdrolüüs. Konstrueeritud tüves olid deleteerunud CsdA ja RbbA valkude geenid. Selleks, et uurida CsdA valgu ATPaasset aktiivsust konstrueeriti *rbbA* ja *csdA* deletsioonitüvi, sest kirjanduse andmetel põhjustab ATP hüdrolüüsi RbbA valk (Kiel *et al.*, 1991).

Antud töö alaeesmärgiks oli analüüsida ribosoomide biogeneesi olukorras, kus puuduvad RbbA ja CsdA, hinnates ribosoomi profiili muutust. Saadud tulemustest järeldub, et CsdA ja RbbA valkude geenide deleteerimisel akumulerevad vahepartiklid madalatel temperatuuridel. Vahepartiklite rRNA sisalduse analüüs näitas, et akumulereunud vahepartiklid ja subühikud sisaldavad terviklikku 23S või 16S rRNA-d. Lähtuvalt sellest võib oletada, et ribosoomi partiklites olev terviklik rRNA võib lõpuks jõuda funktsionaalse ribosoomi koosseisu. Antud tulemused on kooskõlas Peil *et al.* (2008) andmetega, mis väidavad, et ribosoomi biogeneesi akumulerevad vahepartiklid on 50S subühiku eellased ja lõpuks jõuavad funktsionaalse ribosoomi koostisesse.

Järgnevas etapis oli kontrollida, kas *rbbA* ja *csdA* puuduliku tüve ribosoomipartiklitel on säilinud mittespetsiifiline ATP hüdrolüüs. Tulemused osutavad, et *rbbA* ja *csdA* geenide deleteerimisel puudub 70S ribosoomidel, pre-50S ja 30S subühikutel detekteeritav ATP hüdrolüüs. Puhastatud CsdA valgu ATPaasse aktiivsuse *in vitro* analüüsist järeldub, et pre-50S ja 30S on võimelised stimuleerima CsdA valgu ATPaasset aktiivsust. *E. coli* MG $\Delta rbbA$ ja $\Delta csdA$ ribosoomi partiklite stimuleeriv toimet võrreldi ribosoomidega metsiktüvest ja vastavatest üksikdeletsioonitüvedest. Tulemuste analüüsimisel selgus, et CsdA helikaas võib kasutada oma substraatidena ribosoomi assambleerumise vahepartikleid, mis ribosoomi biogeneesi käigus võivad jõuda funktsionaalse ribosoomi koosseisu.

**Analysis of the substrate specificity of *Escherichia coli*
RNA helicase CsdA in ribosome biogenesis**

Angelina Panenko

SUMMARY

Ribosome is a ribonucleoprotein particle responsible for protein biosynthesis. Prokaryotic ribosomes consist of the large (50S) and the small (30S) subunits. 50S subunits have two rRNA molecules (23S rRNA and 5S rRNA) and 33 ribosomal proteins. The small subunit has 16S rRNA and 21 ribosomal proteins.

Ribosome biogenesis is a highly coordinated process, which involves the synthesis, processing and modification of both rRNA and ribosomal proteins, and the assembly of the components into ribosomal subunits. Ribosome biogenesis involves a number of extra-ribosomal factors that are necessary for RNA folding during ribosome assembly. One group of those factors is DEAD-*box* RNA helicase, which includes the CsdA protein (Turner *et al.*, 2007).

Despite years of research, the functional description of CsdA protein is still incomplete. Current study was conducted to give a better description of the functions of CsdA protein in ribosome biogenesis. For this CsdA substrates in ribosome biogenesis were determined based on the helicase activity of CsdA. Analysis of the results showed that CsdA helicase can use ribosome assembly intermediate particles as substrates.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajat Aivar Liivi ning professor Jaanus Remmet, kes olid mulle oma kannatlikkuse, professionaalsuse ja abivalmidusega suureks eeskujuks ja toeks. Samuti tänan Silvat Lilleorg väärtuslike nõuannete ja tähelepanekute eest. Minu siirad tänusõnad ka kogu kollektiivile suurepärase seltskonna eest.

Lõpetuseks soovin tänada oma perekonda ja sõpru, kes minusse alati uskunud on.

KASUTATUD KIRJANDUS

Artiklid:

Arai, T., Ishiguro, K., Kimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T. (2015) Single methylation of 23S rRNA triggers late steps of 50S ribosomal subunit assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 25;112(34):E4707-16.

Asai, T., Zaporozhets, D., Squires, C., and Squires C. L. (1999) An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(5):1971–76.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 inframe, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 2: 2006 0008.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4Å resolution. *Science* 289(5481):905-20.

Bizebard, T., Ferlenghi, I., Iost, I., Dreyfus, M. (2004) Studies on three *E. coli* DEAD-box helicases point to an unwinding mechanism different from that of model DNA helicases. *Biochemistry* 43(24):7857–66.

Bram, R. J., Young, R. A., Steitz, J. A. (1980) The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell* 19(2):393-401..

Brandi, A., Spurio, R., Gualerzi, C. O., Pon, C. L. (1999) Massive presence of the *Escherichia coli* ‘major cold-shock protein’ CspA under non-stress conditions. *The EMBO journal* 18(6):1653–59.

Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR System: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst* 54:905–21.

Böddeker, N., Katrin S., and François F. (1997) Characterization of DbpA, an *Escherichia coli* DEAD box protein with ATP independent RNA unwinding activity. *Nucleic Acids Research* 25(3):537–44.

- Bylund, G. O., Wipemo, L. C., Lundberg, L. A. C., Wikström, P. M. (1998) RimM and RbfA are essential for efficient processing of 16S rRNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180(1):73-82.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., Costa, A., Desgres, J., Richarme, G. (2000) The FtsJ / RrmJ heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *J Biol Chem* 275(22):16414-9.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., Richarme, G. (2000) Translational defects of *Escherichia coli* mutants deficient in the Um 2552 23S ribosomal RNA methyltransferase RrmJ / FTSJ. *Biochem Biophys Res Commun* 19;271(3):714-8
- Caldon, C. E., March, P. E. (2003) Function of the universally conserved bacterial GTPases. *Current Opinion in Microbiology* 6(2):135–39.
- Carpousis, A. J. (2007) The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol* 61:71-87.
- Charollais, J., Dreyfus, M., Iost, I. (2004) CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research* 32(9):2751–59.
- Charollais, J., Pflieger, D., Vinh, J., Dreyfus, M., Iost, I. (2003) The DEAD-Box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 48(5):1253–65.
- Chen, S. S., Williamson, J. R. (2013) Characterization of the ribosome biogenesis landscape in *E. coli* using quantitative mass spectrometry. *J Mol Biol* 425(4):767-79
- Chen, X., Court, D. L., Ji, X. (1999) Crystal structure of ERA: A GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(15):8396-401.
- Cherepanov, P. P. and Wackernagel, W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*. 158: 9-14.
- Clatterbuck Soper, S. F., Dator, R. P., Limbach, P. A., Woodson, S. A. (2013) *In vivo* X-ray footprinting of pre-30S ribosomes reveals chaperone-dependent remodeling of late assembly intermediates. *Mol Cell* 52(4):506-16.

- Condon, C., Liveris, D., Squires, C., Schwartz, I., Squires, C. L. (1995) rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *Journal of Bacteriology* 177(14):4152–56.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K., Linder, P. (2006) The DEAD-*Box* protein family of RNA helicases. *Gene* 367(1-2):17–37.
- Dammel, C. S., Noller, H. F. (1995) Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. *Genes and Development* 9(5):626–37.
- Davies, B. W., Köhrer, C., Jacob, A. I., Simmons, L. A., Zhu, J., Aleman, L. M., Rajbhandary, U. L., Walker, G. C. (2010) Role of *Escherichia coli* YbeY, a highly conserved protein, in rRNA processing. *Mol Microbiol* 78(2):506-18.
- de Narvaez, C. C., Schaup, H. W. (1979) *In vivo* transcriptionally coupled assembly of *Escherichia coli* ribosomal subunits. *Journal of Molecular Biology* 134(1):1–22.
- Diaconu, M., Kothe, U., Schlünzen, F., Fischer, N., Harms, J. M., Tonevitsky, A. G., Stark, H., Rodnina, M. V., Wahl, M. C. (2005) Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell* 121(7):991-1004.
- El Hage, A., Sbaï, M., Alix, J. H. (2001) The chaperonin GroEL and other heat-shock proteins, besides DnaK, participate in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* 264(6):796–808.
- Fairman-Williams, M. E., Guenther, U. P., Jankowsky, E. (2010) SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol* 20(3):313-24.
- Formenoy, L. J., Cunningham, P. R., Nurse, K., Pleij, C. W., Ofengand, J. (1994) Methylation of the conserved A1518-A1519 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA by the *ksgA* methyltransferase is influenced by methylations around the similarly conserved U1512-G1523 base pair in the 3' terminal hairpin. *Biochimie* 76(12):1123–28.
- Frank, J., Agrawal, R.K. (2001) Ratchet-like movements between the two ribosomal subunits: their implications in elongation factor recognition and tRNA translocation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2001;66:67-75.

- Fuller-Pace, F. V., Nicol, S. M., Reid, A. D., Lane, D. P. (1993) DbpA: A dead *box* protein specifically activated by 23s rRNA. EMBO J. (9):3619-26.
- Gabashvili, I. S., Agrawal, R. K., Spahn, C. M., Grassucci, R. A., Svergun, D. I., Frank, J., Penczek, P. (2000) Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution. Cell 100(5):537–49.
- Ganoza, M. C., Kiel, M. C. (2001) A ribosomal ATPase is a target for hygromycin B inhibition on *Escherichia coli* ribosomes. Antimicrob Agents Chemother (10):2813-9.
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M., Van Roey, P., Agrawal, R. K., Harvey, S. C., Sali, A., Chapman, M. S., Frank, J. (2003) Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. Cell 113(6):789–801.
- Guo, Q., Yuan, Y., Xu, Y., Feng, B., Liu, L., Chen, K., Sun, M., Yang, Z., Lei, J., Gao, N. (2011) Structural basis for the function of a small GTPase RsgA on the 30S ribosomal subunit maturation revealed by cryoelectron microscopy. Proc Natl Acad Sci USA 108(32):13100-5
- Havelund, J. F., Giessing, A. M., Hansen, T., Rasmussen, A., Scott, L. G., Kirpekar, F. (2011) Identification of 5-hydroxycytidine at position 2501 concludes characterization of modified nucleotides in *E. coli* 23S rRNA. Journal of Molecular Biology 411(3):529–36.
- Held, W. A., Ballou, B., Mizushima, S., Nomura, M. (1974) Assembly mapping of 30 S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. Further studies. J Biol Chem 249(10):3103-11.
- Holmes, K. L., Culver, G. M. (2004) Mapping structural differences between 30S ribosomal subunit assembly intermediates. Nature structural & molecular biology 11(2):179–86.
- Hwang, J., Inouye, M. (2001) An essential GTPase, der, containing double GTP-binding domains from *Escherichia coli* and *Thermotoga maritima*. Journal of Biological Chemistry 276(33):31415–21.
- Iost, I., Bizebard, T., Dreyfus, M. (2013) Functions of DEAD-*box* proteins in bacteria: current knowledge and pending questions. Biochim Biophys Acta 1829(8):866-77.
- Iost, I., Dreyfus, M., Linder, P. (1999) Ded1p, a DEAD-*box* protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. J Biol Chem 274(25):17677-8

- Iost, I., Dreyfus, M. (2006) DEAD-*box* RNA helicases in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research 34(15):4189–97.
- Jain, C. (2008) The *E. coli* RhlE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. RNA 14(2):381-9
- Jiang, J., Seo, H., Chow, C. S. (2016) Post-transcriptional modifications modulate rRNA structure and ligand interactions. Acc Chem Res 49(5):893-901
- Jiang, M., Datta, K., Walker, A., Strahler, J., Bagamasbad, P., Andrews, P. C., Maddock, J. R. (2006) The *Escherichia coli* GTPase CgtAE is involved in late steps of large ribosome assembly. J Bacteriol 188(19):6757-70.
- Jin, D. J., Cagliero, C., Zhou, Y. N. (2012) Growth rate regulation in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Rev. 36(2):269-87.
- Jones, P. G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W., Inouye, M. (1996) Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 93(1):76-80.
- Kaczanowska, M., Rydén-Aulin, M. (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev 71(3):477-94.
- Karginov, F. V., Caruthers, J. M., Hu, Y., McKay, D. B., Uhlenbeck, O. C. (2005) YxiN is a modular protein combining a DEx(D/H) core and a specific RNA-binding domain. J Biol Chem 280(42):35499-505. Epub 2005 Aug 22.
- Kiel, M. C., Aoki, H., Ganoza, M. C. (1999) Identification of a ribosomal ATPase in *Escherichia coli* cells. Biochimie 81(12):1097-108.
- Kiel, M. C., Ganoza, M. C. (2001) Functional interactions of an *Escherichia coli* ribosomal ATPase. Eur J Biochem 268(2):278-86.
- Kossen, K., Karginov, F. V., Uhlenbeck, O. C. (2002) The carboxy-terminal domain of the DExDH protein YxiN is sufficient to confer specificity for 23S rRNA. J Mol Biol 324(4):625-36.

- Li, Z., Deutscher, M. P. (1995) The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(15):6883-6.
- Liiv, A., Karitkina, D., Maiväli, U., Remme, J. (2005) Analysis of the function of *E. coli* 23S rRNA helix-loop 69 by mutagenesis. *BMC Mol Biol* 6:18.
- Liiv, A., Remme, J. (2004) Importance of transient structures during post-transcriptional refolding of the pre-23S rRNA and ribosomal large subunit assembly. *J Mol Biol* 342(3):725-41.
- Lindahl, L. (1975) Intermediates and time kinetics of the *in vivo* assembly of *Escherichia coli* ribosomes. *Journal of Molecular Biology* 92(1):15–37.
- Linder, P. (2006) Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Research* 34(15):4168–80.
- Liu, Q., Fredrick, K. (2016) Intersubunit bridges of the bacterial ribosome. *Journal of Molecular Biology* S0022-2836(16)00114-5.
- Łobocka, M.B., Rose, D.J., Plunkett, G., Rusin, M., Samojedny, A., Lehnherr, H., Yarmolinsky, M.B., Blattner, F.R. (2004) Genome of bacteriophage P1. *J Bacteriol* 186(21):7032-68.
- Lorsch, J. R. (2002) RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. *Cell* 109(7):797–800.
- Lu, J., Aoki, H., Ganoza, M. C. (1999) Molecular characterization of a prokaryotic translation factor homologous to the eukaryotic initiation factor eIF4A. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31(1):215–29.
- Maeda, M., Shimada, T., Ishihama, A. (2015) Strength and regulation of seven rRNA promoters in *Escherichia coli*. *PLoS One* 10(12):e0144697.
- Maki, J. A., Schnobrich, D. J., Culver, G. M. (2002) The DnaK chaperone system facilitates 30S ribosomal subunit assembly. *Molecular Cell* 10(1):129–38.

- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology* 19(6):560–67.
- Mohr, S., Stryker, J. M., Lambowitz, A. M. (2002) A DEAD-*box* protein functions as an ATP-dependent RNA chaperone in group I intron splicing. *Cell* 109(6):769–79.
- Moll, I., Grill, S., Gründling, A., Bläsi, U. (2002) Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD-*box* helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 44(5):1387–96.
- Nicol, S. M., Fuller-Pace, F. V. (1995) The "DEAD *box*" protein DbpA interacts specifically with the peptidyltransferase center in 23S rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(25):11681–5.
- Nierhaus, K. H. (1991) The assembly of prokaryotic ribosomes. *Biochimie* 73(6):739–55.
- Nierhaus, K. H., Dohme, F. (1974) Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71(12):4713–7.
- Nikulin, A., Eliseikina, I., Tishchenko, S., Nevskaya, N., Davydova, N., Platonova, O., Piendl, W., Selmer, M., Liljas, A., Drygin, D., Zimmermann, R., Garber, M., Nikonov, S. (2003) Structure of the L1 protuberance in the ribosome. *Nature structural biology* 10(2):104–8.
- Nord, S., Bylund, G. O., Lövgren, J. M., Wikström, P. M. (2009) The RimP protein is important for maturation of the 30S ribosomal subunit. *Journal of Molecular Biology* 386(3):742–53.
- Ofengand, J., Del Campo, M. (2004) Modified nucleosides of *Escherichia coli* ribosomal RNA. *EcoSal Plus* 1(1)
- Owttrim, G. W. (2013) RNA helicases: diverse roles in prokaryotic response to abiotic stress. *RNA biology* 10(1):96–110.
- Peil, L., Virumäe, K., Remme, J. (2008) Ribosome assembly in *Escherichia coli* strains lacking the RNA helicase DeaD/CsdA or DbpA. *FEBS Journal* 275(15):3772–82.

- Phadtare, S. (2011) Unwinding activity of cold shock proteins and RNA metabolism. *RNA Biology* 8(3):394–7.
- Pietras, Z., Hardwick, S. W., Swiezewski, S., Luisi, B. F. (2013) Potential regulatory interactions of *Escherichia coli* RraA protein with DEAD-*box* helicases. *Journal of Biological Chemistry* 288(44):31919–29.
- Prud'homme-Généreux, A., Beran, R. K., Iost, I., Ramey, C. S., Mackie, G. A., Simons, R. W. (2004) Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Molecular Microbiology* 54(5):1409–21.
- Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108(4):557–72.
- Ramakrishnan, V., Moore, P. B. (2001) Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol* 11(2):144-54.
- Rocak, S., Linder, P. (2004) DEAD-*box* proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature reviews. Nat Rev Mol Cell* 5(3):232-41.
- Rogers, G. W. Jr., Lima, W. F., Merrick, W. C. (2001) Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *J Biol Chem* 276(16):12598-608
- Roy-Chaudhuri, B., Kirthi, N., Kelley, T., Culver, G. M. (2008) Suppression of a cold-sensitive mutation in ribosomal protein S5 reveals a role for RimJ in ribosome biogenesis. *Molecular Microbiology* 68(6):1547–59.
- Sato, A., Kobayashi, G., Hayashi, H., Yoshida, H., Wada, A., Maeda, M., Hiraga, S., Takeyasu, K., Wada, C. (2005) The GTP binding protein Obg homolog ObgE is involved in ribosome maturation. *Genes Cells* 10(5):393-408.
- Schroeder, R., Barta, A., Semrad, K. (2004) Strategies for RNA folding and assembly. *Nature reviews. Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11):908-19.
- Sergeeva, O. V., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A. (2014) Ribosome: lessons of a molecular factory construction. *Mol Biol (Mosk)* 48(4):543-60.

- Shajani, Z., Sykes, M. T., Williamson, J. R. (2011) Assembly of bacterial ribosomes. Annual review of biochemistry 80:501–26.
- Sharpe Elles, L. M., Sykes, M. T., Williamson, J. R., Uhlenbeck, O. C. (2009) A dominant negative mutant of the *E. coli* RNA helicase DbpA blocks assembly of the 50S ribosomal subunit. Nucleic Acids Res 37(19):6503-14
- Siibak, T., Remme, J. (2010) Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. RNA (New York, N.Y.) 16(10):2023–32.
- Sirdeshmukh, R., Schlessinger, D. (1985) Ordered processing of *Escherichia coli* 23S rRNA *in vitro*. Nucleic Acids Res 13(14):5041-54.
- Sivaraman, J., Iannuzzi, P., Cygler, M., Matte, A. (2004) Crystal structure of the RluD pseudouridine synthase catalytic module, an enzyme that modifies 23S rRNA and is essential for normal cell growth of *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology 335(1):87–101.
- Spillmann, S., Dohme, F., Nierhaus, K. H. (1977) Assembly *in vitro* of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes: proteins essential for the first heat-dependent conformational change. Journal of Molecular Biology 115(3):513–23.
- Srivastava, A. K., Schlessinger, D. (1990) Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. Annu Rev Microbiol 44:105-29.
- Stokes, J. M., Brown, E. D. (2015) Chemical modulators of ribosome biogenesis as biological probes. Nature chemical biology 11(12):924–32.
- Story, R. M., Li, H., Abelson, J. N. (2001) Crystal structure of a DEAD *box* protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. Proc Natl Acad Sci USA 98(4):1465-70.
- Sykes, M. T., Williamson, J. R. (2009) A complex assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. Annu Rev Biophys 38:197-215
- Zhao, X., Jain, C. (2011) DEAD-*box* proteins from *Escherichia coli* exhibit multiple ATP-independent activities. Journal of Bacteriology 193(9):2236–41.

Tanner, N. K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., Linder, P. (2003) The Q motif: a newly identified motif in DEAD *box* helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell* (1):127-38.

Toone, W. M., Rudd, K. E., Friesen, J. D. (1991) DeaD, a new *Escherichia coli* gene encoding a presumed ATP-dependent RNA helicase, can suppress a mutation in *rpsB*, the gene encoding ribosomal protein S2. *J Bacteriol* 173(11):3291-3

Trubetskoy, D., Proux, F., Allemand, F., Dreyfus, M., Iost, I. (2009) SrmB, a DEAD-*box* helicase involved in *Escherichia coli* ribosome assembly, is specifically targeted to 23S rRNA *in vivo*. *Nucleic Acids Research* 37(19):6540–49.

Tsu, C. A., Kossen, K., Uhlenbeck, O. C. (2001) The *Escherichia coli* DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23S rRNA. *RNA* (New York, N.Y.) 7(5):702–9.

Turner, A. M., Love, C. F., Alexander, R. W., Jones, P. G. (2007) Mutational analysis of the *Escherichia coli* DEAD *box* protein CsdA. *Journal of bacteriology* 189(7):2769–76.

Wada, A. (1998) Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes Cells* 3(4):203-8.

Weitzmann, C. J., Cunningham, P. R., Nurse, K., Ofengand, J. (1993) Chemical evidence for domain assembly of the *Escherichia coli* 30S ribosome. *Faseb J* 7(1):177–80.

Verstraeten, N., Fauvart, M., Versées, W., Michiels, J. (2011) The universally conserved prokaryotic GTPases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(3):507-42, second and third pages of table of contents

Williamson, J. R. (2003) After the ribosome structures: how are the subunits assembled? *RNA* (New York, N.Y.) 9(2):165–67.

Williamson, J. R. (2008) Biophysical studies of bacterial ribosome assembly. *Curr Opin Struct Biol* 18(3):299-304.

Wilson, D. N., Gupta, R., Mikolajka, A., Nierhaus, K. H. (2009) Ribosomal proteins: role in ribosomal functions. *Encyclopedia of Life Sciences*.

Wilson, D. N., Nierhaus, K. H. (2007) The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42(3):187-219.

Wimberly, B. T., Brodersen, D. E. Clemons, Jr., William, M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonnrhein, C., Hartsch, T., Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407:327–39

Xu, J., Kiel, M. C., Golshani, A., Chosay, J. G., Aoki, H., Ganoza, M. C. (2006) Molecular localization of a ribosome-dependent ATPase on *Escherichia coli* ribosomes. *Nucleic Acids Research* 34(4):1158–65.

Xu, Z., O'Farrell, H. C., Rife, J. P., Culver, G. M. (2008) A conserved rRNA methyltransferase regulates ribosome biogenesis. *Nature structural & molecular biology* 15(5):534–6.

Yamamoto, H., Qin, Y., Achenbach, J., Li, C., Kijek, J., Spahn, C. M., Nierhaus, K. H. (2014) EF-G and EF4: translocation and back-translocation on the bacterial ribosome. *Nature reviews. Microbiology* 12(2):89–100.

Yamanaka, K., Inouye, M. (2001) Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 183(9):2808–16.

Yusupov, M. M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., Noller, H. F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)* 292(5518):883–96.

Raamatud:

Kuusk, S., Sedman, T., Sedman, T. (2002) Recombinant yeast mtDNA helicases, p. 303 – 316 *In Mitochondrial DNA Methods and Protocols*, William C. (ed.) Humana Press vol. 197

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://apollo.chemistry.gatech.edu/>

Lihtlitsents

Mina, Angelina Panenko
(sünnikuupäev: 26.09.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

***Escherichia coli* ribosoomi biogeneesis osaleva RNA helikaasi CsdA
substraadispetsiifika analüüs**

mille juhendaja on Aivar Liiv,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.5.2016